

**Utvikling og testing av Multiple-locus variable-number (MLVA)
tandem repeat analysemetode for Shigella sp.**

**Hovedfagsoppgave i mikrobiologi for graden Candidata Pharmaciae av
Monica Rawal**



Utført ved

Avdeling for næringsmiddelbårne infeksjoner

Divisjon for smittevern

Nasjonalt folkehelseinstitutt

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Høsten 2007

**Utvikling og testing av Multiple-locus variable-number (MLVA)
tandem repeat analysemetode for Shigella sp.**

**Hovedfagsoppgave i mikrobiologi for graden Candidata Pharmaciae av
Monica Rawal**

Veiledere:

Dr. Philos. Bjørn Arne Lindstedt,

Avdeling for næringsmiddelbårne infeksjoner

Divisjon for smittevern

Nasjonalt folkehelseinstitutt

Og

Førsteamanuensis Ida K. Hegna,

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

Universitetet i Oslo

Forord

Denne oppgaven ble utført ved Nasjonalt folkehelseinstitutt, Divisjon for smittevern, Avdeling for næringsmiddelbårne infeksjoner, ved DNA laboratoriet, i perioden november 2006 til november 2007.

Jeg vil takke min hovedveileder: Bjørn-Arne Lindstedt for at du alltid har tatt deg god tid til å svare på mine spørsmål, selv om du har hatt ekstremt mye å gjøre. Jeg setter veldig stor pris all hjelp jeg fikk med alle problemene under hovedfaget. Jeg vil også takke for generell kjempegod veiledning.

Takk til internveileder Ida K. Hegna ved Farmasøytisk institutt for engasjementet i oppgaven og veldig god hjelp under skriveprosessen.

Jeg vil takke Inger Løbersli for å ha lært meg opp i det meste og alltid ha tid til å hjelpe meg med alle problemer underveis. Tusen takk til Traute Vardun og Elisabeth Hoff for opplæring, problemløsning og mange gode råd underveis.

Takk til Lin Thorstensen Brandal for gode råd om videre fremdrift av oppgaven. Takk til Kjersti Haugum for god hjelp under skriveprosessen. Takk til Lena Aas- Pedersen for hjelp underveis i oppgaven.

Tusen takk til hele SMAN under Georg Kapperud, for det varme og inkluderende miljøet.

Monica Rawal

Sammendrag

Shigella er en den vanligste årsaken til dysenteri, og rammer særlig barn i u-land. Årlig dør ca. 165 millioner mennesker av sykdom forårsaket av *Shigella*. Av de fire *Shigella* artene *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* og *Shigella sonnei* er *S. flexneri* er den hyppigst forekommende i u-land. *S. sonnei* er den vanligste i i-land og smitte skjer typisk ved internasjonal reise eller av kontaminerte matvarer. Genotyping av bakterier med epidemisk potensial er vanlig, og i denne oppgaven ble det utviklet en PCR basert metode for å type *Shigella* sp. Metoden er "multiple-locus variable number tandem repeat analysis" (MLVA). For MLVA utnyttet bestemte hypervariable områder på genomet som består av repetisjonenheter etter hverandre. Disse repeterte områdene kalles "variable number of tandem repeat" (VNTR) loci. Antall repetisjonsenheter på et locus varierer som oftest mellom ulike bakteriestammer og er en veldokumentert stammedefinerende parameter. MLVA gjør det mulig å identifisere og spore ulike stammer av *Shigella* sp. ved sykdomsutbrudd av bakterien.

Åtte ulike *Shigella* primeresett ble prøvd ut parvis på 20 bakterier for å undersøke om de ga PCR produkt. Syv av disse primerparene ga PCR produkt og ble merket med tre ulike fluorescerende farger. De syv ulike primersettene ble blandet i en reaksjon til en PCR multipleks, som ble utprøvd på 50 bakterier og analysert på kapillærelektroforese (ABI 310). En av de syv primersettene ble forkastet etter disse 50 analysene, da PCR produktene til dette primersettet ikke var polymorfe nok. Med PCR multipleksen bestående av seks primersett ble ca. 130 flere bakterier typet. For å undersøke metodens reproducerbarhet ble ca. 10 % av alle typede bakterier analysert på nytt. Stabilitetsundersøkelser av VNTR loci ble også gjort ved å omså fire *Shigella* bakterier ca. 75 ganger.

Locusdiversiteten (D) viste særlig gode differensierende resultater for ett primersett (SHTR4) med D-verdi på 0,91 for *Shigella* sp. SHTR4 viste en svært god D-verdi på 0,88 for *S. dysenteriae*, men de andre primerene hadde ikke like gode D-verdier for denne arten. Det bør derfor jobbes videre for å finne flere primere som kan bidra til bedre diversitet i denne arten. Totalt sett av *Shigella* sp. var de beste D verdiene for *S. sonnei*, med tre ulike primersett som ga D-verdiene 0,94, 0,89 og 0,87. Både stabilitetstesten og reproducerbarhetsundersøkelsen viste utmerket stabilitet og reproducerbarhet. Generelt sett viste dendrogrammet meget god separasjon av *S. sonnei* og *S. flexneri*, dette er nyttig ettersom disse artene er de hyppigst

forekommende i verden. *S. sonnei* ble separert ut i en egen gren, det vil si at denne arten virker homogen og denne observasjonen samsvarer med tidligere studier.

Forkortelser

A	Adenin
ABI 310	ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer
bp	Basepar
C	Cytosin
ddH ₂ O	Destilert vann
DdNTP	Dideoksyribonukleotidtrifosfater
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoksynukleotidtrifosfat
EHEC	Enterohemoragisk <i>E.coli</i>
EIEC	Enteroinvasiv <i>E.coli</i>
EM	Erlenmeyerkolbe
EtBr	Etidiumbromid
G	Guanin
HUS	Hemolytisk uremisk syndrom
I-land	Industriland
IS-elementer	Insertion sequences – insersjonsekvenser
LPS	Lipopolysaccharid - lipopolysakkarid
MLEE	Multilocus enzym electrophoresis
MLST	Multiple-locus sequence typing
MLVA	Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction – polymerase kjedereaksjon
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
POP	Performance optimized polymer
R-plasmid	Resistens-plasmid
rpm	Revolutions per minute – runder per minutt
SSI	Statens Serum Institutt, Danmark
SSM	Slipped strand mispairing
SSR	Short sequence repeat
sp.	Species
Subsp.	Subspecies
T	Tymin

TBE-buffer	Tris-borat-EDTA-buffer
TTSS	Type III sekresjonssystem
U	Uracil
U-land	Utviklingsland
UV	Ultraviolet - ultrafiolett
VNTR	Variable number of tandem repeats
WHO	World Health Organization

Innholdsfortegnelse

Forord	III
Sammendrag	IV
Forkortelser	VI
Innholdsfortegnelse	VIII
1. Innledning	1
1.1. Shigella	1
1.1.1. Historisk bakgrunn	1
1.1.2. Klassifiseringen av <i>Shigella</i>	1
1.1.3. Nomenklatur	2
1.1.4. Virulensfaktorer	3
1.1.5. Sykdommen shigellose	5
1.1.6. Smittemåte	6
1.1.7. Innsidens i Norge og verden	6
1.1.8. Forebygging	8
1.1.9. Behandling og resistens	8
1.2. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA)	9
1.2.1. Bakgrunn	9
1.2.2. MLVA typing av bakterier	10
1.2.3. Harmonisering av MLVA data	10
1.2.4. IS-elementer (Insertion Sequence)	11
1.2.5. MLVA database	11
1.3. Pulse-field gelelektroforese - PFGE	11
1.4. Utbruddsoppløring og sykdomsovervåking	12
1.4.1. Nasjonalt referanselaboratorium ved FHI – Bidrar til å oppdage og oppklare utbrudd.	12
1.4.2. Utbruddsoppløring og sykdomsovervåking med MLVA	13
1.5. MLVA metodeutvikling	13
1.6. Problemstilling og hensikt med oppgaven	14
1.6.1 Problemstilling	14
1.6.2. Hensikt med oppgaven	14
2. Materialer	15
3. Metoder	18
3.1. Primerdesign	18
3.1.1. Prinsipp	18
3.2. Bakterieisolater	19
3.3. Isolering av DNA	19
3.3.1. Isolering av DNA ved koking	19
3.3.2. Isolering av DNA med BioRobot	19
3.3.2.1. Prinsipp	19
3.3.2.2. Utførelse	20
3.4. PCR – Polymerase kjedereaksjon	20
3.4.1. Prinsipp	20
3.4.2. Utførelse	21
3.5. Agarose gelelektroforese	23

3.5.1. Prinsipp	23
3.5.2. Utførelse	23
3.5.2.1. Agarosegel 1 %	23
3.5.2.2. Agarosegel 1 % - mindre gelform	24
3.5.2.3. Separasjon av PCR produkt på FlashGel 1.2 %	25
3.6. Størrelsesbestemming av PCR produkt med BioAnalyzer	25
3.6.1. Prinsipp	25
3.6.2. Hensikt	25
3.6.3 Utførelse	26
3.7. DNA mengdebestemmelse med NanoDrop	26
3.7.1. Prinsipp	26
3.8. Sekvensering	27
3.8.1. Prinsipp	27
3.8.2. Hensikt	27
3.8.3. Utførelse	27
3.9. Kapilærelektroforese - ABI 310 og ABI 3130 XL	29
3.9.1. Prinsipp	29
3.9.2. Utførelse	29
3.9.2.1. ABI 310	29
3.10. MLVA (Multiple-Locus Variant-repeat Analysis)	31
3.10.1. Prinsipp	31
3.10.2. Utførelse	31
3.10.2.1. MLVA– <i>Shigella</i> metoden	31
3.10.2.2. MLVA– <i>E.coli</i> metoden	32
3.11. MLVA– <i>Shigella</i> metodens reproduserbarhet og stabilitet	32
3.11.1. Utførelse av reproduserbarhetsstudie	32
3.11.2. Utførelse av stabilitetsstudie	32
4. Resultater	33
4.1. Utprøving av <i>Shigella</i> primere	33
4.2. Størrelsesbestemming av PCR produkter på BioAnalyzer og fargevalg av primere	33
4.3. MLVA- <i>Shigella</i> metoden	34
4.4. MLVA– <i>E. coli</i> metoden	36
4.5. Tildeling av allele nummer for MLVA– <i>Shigella</i> metoden.	36
4.6. Sekvensering	38
4.7. Reproduserbarhet	40
4.8. Stabilitetsstudie	41
4.9. Locusdiversitet	41
4.10. Dendrogram	42
4.11. Minimum Spanning Tree - MST	46
5. Diskusjon	48
5.1. MLVA generelt	48
5.2. MLVA– <i>Shigella</i> metoden	49
5.2.1. Fargevalg	49
5.2.2. Locusdiversitet	50
5.2.3. Tolking av dendrogram og minimum spanning tree (MST)	50
5.2.4. Reproduserbarhet og stabilitet	52
5.2.5. Sekvensering og IS-elementer	53
5.2.6. <i>E. coli</i> undersøkt med MLVA– <i>Shigella</i> metoden	54
5.3. MLVA– <i>E. coli</i> metoden	54

5.4. Utnyttelsesmulighetene av en MLVA-Shigella metode	54
5.5. Pulsefelt gelelektroforese - PFGE	55
5.6. Andre genotypiske metoder	56
5.7. Fremtidig arbeid	56
6. Konklusjon	57
7. Referanseliste	58

1. Innledning

1.1. *Shigella*

1.1.1. Historisk bakgrunn

Dysenteri har lenge vært klinisk kjent, sykdommen er blitt beskrevet av Hippokrates (ca. 460—ca. 377 f.Kr) og i Det Gamle Testamentet. Dysenteri nevnes i forbindelse med ulike kriger gjennom historien, da dysenteri ofte var årsaken til mer skade blant soldatene enn selve krigsskadene. Det var ikke før på slutten av 1800-tallet at de to hovedårsakene til dysenteri, bakterien *Shigella* sp. og amøben *Entamoeba histolytica*, kunne separeres. I gamle tekster regner man med at tilfeller av epidemisk dysenteri kom av *Shigella*, mens ved sporadisk dysenteri og leversykdom hos voksne kom dette mest sannsynlig av *E. histolytica* (1;2).

Shigella dysenteriae var den første *Shigella* arten som ble isolert og oppdaget av Dr. Kiyoshi Shiga i 1896. Shiga forsket på dysenteriutbrudd som forårsaket epidemier med høye dødstall i Japan på slutten av 1800 tallet (3). Dr Simon Flexner, en amerikansk bakteriolog, fant omtrent samtidig med Shiga en lignende, men serologisk ulik organisme i avføringen til dysenteripasienter i Filippinene. Denne organismen ble kalt *Shigella flexneri* (1). *Shigella sonnei* er oppkalt etter Carl Olaf Sonne, en dansk bakteriolog (4). *Shigella boydii* var den siste av *Shigella* artene som ble klassifisert i 1938 av Sir John Boyd, en britisk bakteriolog, som isolerte bakterien i Bangalore, India (2).

1.1.2. Klassifiseringen av *Shigella*

Shigella tilhører familien Enterobacteriaceae, og *Shigella* blir nå av mange betraktet som en variant av *Escherichia. coli* på grunn av den genetiske likheten (5). *Shigella* organismer er små gram-negative staver. De er ikke kapslet, ikke motile, ikke sporulerende og fakultativt anaerobe bakterier (1;3).

Shigella klassifiseres i fire arter på bakgrunn av en kombinasjon av biokjemiske og serologiske egenskaper, se tabell 1-1. Den serologiske typingen av *Shigella* bestemmes på basis av O-antigenet til det bakterielle overflateantigenet LPS. LPS består av en toksisk lipid A del, et kjerneområde med polysakkarider og terminale O-polysakkararider. De terminale O-polysakkaridene (O-antigenet) varierer mye og er basis for den immunologiske spesifisiteten

som resulterer i bestemte serotyper og subserotyper (6). Det eksisterer flere identiske eller nærmest identiske O-antigener som er felles for *E. coli* og *Shigella* ettersom slektskapet mellom bakteriene er så nært. Dette gjør den serologiske bestemmelsen vanskelig, det er derfor nødvendig å utføre biokjemiske tester for å identifisere *Shigella* stammene korrekt (7).

Tabell 1-1. Inndeling av *Shigella* i arter og serotyper er basert på O-antigenet, fordi *Shigella* mangler flagell antigen og kapsel antigen som *E. coli* har (6).

<i>Shigella</i> arter (gruppe)	Antall serotyper og subserotyper	Viktigste epidemiologiske nisje
<i>S. dysenteriae</i> tidligere kalt <i>S. shigae</i> (gruppe A)	15	Epidemier og pandemier av alvorlig Shiga (<i>S. dysenteriae</i> 1) dysenteri
<i>S. flexneri</i> (gruppe B)	14	Endemisk shigellose hos barn i u-land
<i>S. boydii</i> (gruppe C)	20	Tilfeller av endemisk shigellose i u-land i visse områder.
<i>S. sonnei</i> (gruppe D)	1	Endemisk shigellose i u-land og reisediaré

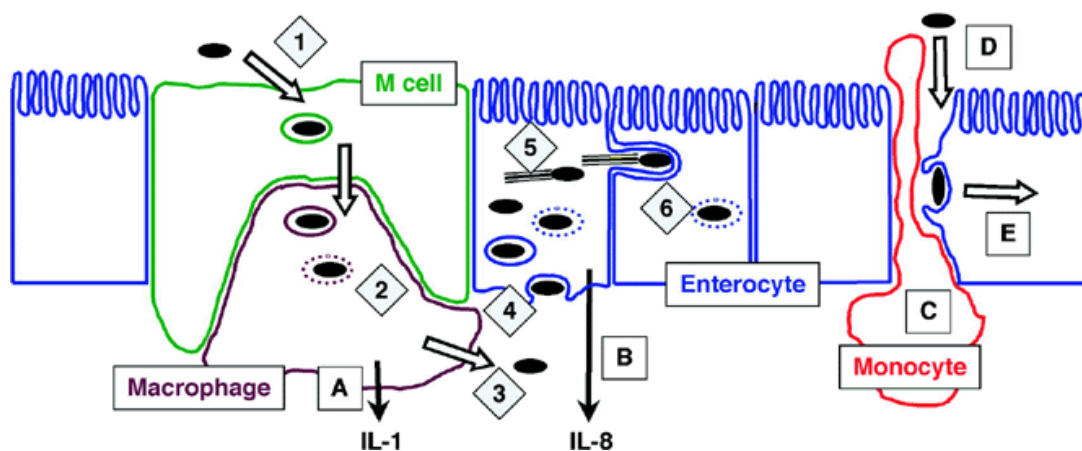
1.1.3. Nomenklatur

Nomenklaturen for *Shigella* kunne vært ganske annerledes i dag ettersom *Shigella* artene er like nære i slektskap til *Escherichia coli* som til hverandre. Det er foreslått å inkludere alle *Shigella* stammene inn under *E. coli*, unntatt *S. boydii* 13 som er forskjellig fra både *Shigella* og *E. coli* (8). *S. boydii* 13 tilhører mest sannsynlig en annen art, *Escherichia albertii* (9). Bakgrunnen for å slå sammen *Shigella* og *E. coli* ligger i at de deler 80 % eller mer av nukleotidsekvensene, og publiserte ribosomale RNA sekvenser er nesten identiske (mer enn 99 % homologi). Disse fakta bekrefter forslaget om at *Shigella* sp. riktigere betraktes som patotyper eller kloner av *E. coli* (4). Forskjellene mellom *E. coli* og *Shigella* har vært vanskelig å definere siden *E. coli* og *Shigella* deler mange egenskaper. Enteroinvasiv *E. coli* (EIEC) ligner særlig på *Shigella* i patogenesen og i tillegg ligner de i biokjemiske egenskaper. Enterohemoragisk *E. coli* (EHEC) ligner *Shigella dysenteriae* 1 ved at de har lignende cytotoxiner som forårsaker svært alvorlig sykdom (8). En fylogenetisk studie viser at *Shigella* antageligvis har oppstått fra *E. coli* flere ganger (syv ganger), og er et eksempel på konvergent evolusjon (10). Dette forklarer hvorfor mange *Shigella* stammer er så ulike hverandre. Det er foreløpig medisinsk nyttig å beholde nomenklaturen slik den er i dag, da linken mellom genus *Shigella* og sykdommen shigellose raskt kobles sammen. Dette faktum

fortsetter å påvirke klassifiseringen av *Shigella* ved at stammer som kan gi dysenteri blir vurdert lagt til dette genus, selv om International Committee on Bacteriological Nomenclature for the classification of *Enterobacteriaceae* har foreslått at patogenitet (dysenteri) ikke skal påvirke klassifiseringen. Stammer som ikke gir dysenteri, men gir biokjemiske reaksjoner som er konsistente med *Shigella* blir ikke inkludert i dette genus, men legges til atypisk *E. coli*. *Shigella* har også egenskaper som er ulik *E. coli*, *Shigella* er godt vertstilpasset mennesker og primater (apekatter og sjimpanser) og har på denne måten en mye smalere nisje enn *E. coli* (4). I dag vil kliniske laboratorier ha større utbytte av å bestemme tilstedeværelsen av virulensgener for både *Shigella* og *E. coli*, fremfor å fokusere på hva som skiller disse bakteriene for artsnavnsetting (7).

1.1.4. Virulensfaktorer

De viktigste virulensfaktorene i *Shigella* er deres invaderende og cytotoksiske egenskaper. Til forskjell fra andre patogene *E. coli* mangler *Shigella* adhesjonsfaktorer (11). Under følger en beskrivelse av invasjonen.



Figur 1-1. Modell av patogenesen induisert av *Shigella* sp. i tykktarmen (12).

- 1) Bakterien invaderer M-cellene i tarmmucosa og krysser på denne måten epitellaget.
- 2) Makrofager fagocytterer bakterien, her induserer bakterien apoptose i makrofagen og unnslipper dermed makrofagen.
- 3) Bakterien kommer over på basolateral side hvor den fester seg til vertscellen.
- 4) Bakterien tas opp av vertscellen ved rearrangering av cytoskeletonet til cellemembranen, dette fører til "membranruffling" en type skvulpe effekt som resulterer i internalisering av bakterien i en endocytisk vesikkel.

- 5) Inne i vertscellen lyserer bakterien vesikkelmembranen som omgir bakterien, slik at bakterien kommer inn i vertscellens cytoplasma. Her fordobles de med en generasjonstid på 40 min.
- 6) Bakterien kan bevege seg inne i vertscellen uten flageller, noe som er ganske uvanlig. Denne motiliteten kommer av at det dannes lange aktinfilamenter fra bakteriens ene pol og danner spor som fører til at bakterien beveger seg gjennom vertscellens cytoplasma. Et protein, som uttrykkes i den ytre membranen til bakterien, katalyserer polymeriseringen av disse vertscelle aktinfilamentene. Muterte *Shigella* stammer som mangler denne intracellulære motiliteten gir et mye mildere sykdomsbilde.
- 7) *Shigella* avgir LPS og peptidoglycan i vertens cytoplasma under celledelingen, dette gir en sterk inflammatorisk respons, som fører til rekrutteringen av monocytter. Monocytene destabiliserer epitelbarrieren når de migrer igjennom den, slik at det blir lettere for flere bakterier å invadere vertscellen fra luminal side (4;12).

Under koloniseringen avgir *Shigella* mange virulensdeterminanter (flere enn 25) inn i vertscellen og det ekstracellulære området, gjennom type III sekresjonssystem (TTSS)(11). Hoveddeterminantene kalles effektorer. Når *Shigella* kommer i kontakt med epitelcellene, stimuleres TTSS og leverer effektorer som: IpaA, IpaB, IpaC, IpgB, IpgD, VirA inn i vertscellen. Effektorene setter i gang polymerisering og depolymerisering av aktin når bakterien trenger inn i vertscellen. Når *Shigella* er i vertscellen leveres også andre effektorer via TTSS, som IcsB, IpaH, OspG og VirA. Alle effektorene og komponentene til TTSS kodes eksklusivt av gener som er tilstede på et 220 kb virulensplasmid. Flere *ipaH* gener som kodes av virulensplasmidet er også tilstede på kromosomet. Dette virulensplasmidet finnes i både *Shigella* og EIEC stammer. (11;12).

S. dysenteriae type 1 er den eneste av *Shigella* sp. som produserer det potente cytotoksinet shiga toxin (A1/B5 toksiner), kodet av genene *stxA* og *stxB* på kromosomet. Shiga toxin skilles ikke aktivt ut av cellen, men avgis ved cellelysering. Toksinets hovedeffekt er på små blodårer og det virker synergisk med LPS. Disse effektene kan til sammen gi den mest alvorlige formen av shigellose, hemolytisk uremisk syndrom (HUS) (4;7).

1.1.5. Sykdommen shigellose

Shigellose forårsakes av alle fire arter av *Shigella*. *S.dysenteriae* og *S. boydii* er de alvorligste, mens *S. sonnei* og *S. flexneri* gir mildere sykdomsbilde og er de hyppigst forekommende i Norge. Sykdommen rammer hovedsakelig tykktarmen og kalles også bakteriell dysenteri (13). I u-land forekommer flest tilfeller hos barn mellom et og fire år, mens i i-land er sykdommen vanligere hos voksne. I USA og Europa er barn i barnehager, immigrantarbeidere, reisende til u-land, individer på institusjoner og homoseksuelle menn særlig utsatt (3;6;14).

Mennesket er den eneste naturlige verten for *Shigella*, men apekatter og sjimpanser kan også smittes. Muligheten til å studere sykdomsforløpet i primater og frivillige voksne mennesker har vært svært nyttig for å kunne studere patogenese, infeksjon, immunitet og evaluere mulige *Shigella* vaksiner. Ti *S.dysenteriae* organismer var nok til å indusere klinisk infeksjon i 10 % av frivillige, mens 200 organismer av ulike serotyper ga klinisk infeksjon i over 25 % av frivillige (6).

Inkubasjonsperioden for *Shigella* er en til fire dager, men kan være opptil åtte dager med *S. dysenteriae*. Shigellose utvikles typisk gjennom flere faser. De første symptomene er feber, hodepine, ubehag og av og til oppkast. Ved mild infeksjon oppleves kun vandig diaré, som er sykdomsbilde for 5-15 % av pasienter infisert med *Shigella*. Videreutvikling til dysenteri vil skje i 30-50 % av tilfellene innen timer til dager. Denne tykktarmbetennelsen kommer av at *Shigella* er et mukosainvaderende patogen (se figur 1-1). Typisk dysenteri er diaré med blod og slim, og noen ganger puss. Pasienter med alvorlig infeksjon vil ha løs avføring 20-30 ganger daglig med magekramper og tenesmer. Dehydrering er vanlig. Bakteriemi er uvanlig, utenom i HIV infiserte individer (3;13;15-17).

S.dysenteriae type 1 gir det mest alvorlige sykdomsbilde av *Shigella* sp. og har epidemisk potensiale (18). Både *S.dysenteriae* type 1 og EHEC (Shiga-lignende toksiner, stx1 og stx2) kan gi HUS. Reseptorene for cytotoxinene til EHEC og *Shigella* finnes på nyreceller og tarmceller, det antas derfor at HUS på denne måten kan føre til akutt nyresvikt og hemolytisk anemi. HUS er den mest dødelige varianten av shigellose og rammer særlig barn (2;5;19).

De fleste tilfellene av shigellose i ellers friske individer er selvbegrensende, sykdommen går som regel over innen fem til syv dager. De akutte livsfarlige tilfellene finner sted i svake, underernærte barn i u-land (20). Om lag 3 % av de som infiseres med *S. flexneri* utvikler

Reiters sykdom, som karakteriseres ved smerter i leddene, irritasjon i øynene og smertefull urinering. Det er en klar sammenheng mellom Reiters sykdom og genetisk predisposisjon for sykdommen (21).

1.1.6. Smittemåte

Shigellose er et globalt helseproblem, særlig i u-land med dårlig hygiene og forurensset vann. *Shigella* representerer en indeks på hygienivået i en gitt populasjon (22). På steder hvor kloakksystem ikke er godt nok utbygget kan fluer bidra til smittespredning av *Shigella* (23). Den vanligste formen for smittespredning av *Shigella* er kontaktsmitte ved fekal-oral kontakt og smitte gjennom kontaminert vann eller matvarer. I Danmark og Norge er importerte grønnsaker en viktig kilde til shigellose. Sekundærtilfeller under sykdomsutbrudd forekommer relativt ofte når barn er smittet. Det er ganske uvanlig med lange bærertilstander av *Shigella*, men de forekommer og bidrar til smittespredning (2;13;24).

1.1.7. Innsidens i Norge og verden

De årlige tilfellene av shigellose i Norge har holdt seg stabilt gjennom de siste årene (se tabell 1-2). *S. sonnei* er den hyppigst forekommende arten i Norge. Av tabell 1-3. kommer det frem at de fleste tilfellene av shigellose i Norge stammer oftest fra utlandet og særlig fra ikke-europeiske land.

Tabell 1-2. Shigellose i Norge meldt MSIS 2002-2006 etter diagnoseår og arter.

Arter	2002	2003	2004	2005	2006
<i>S. sonnei</i>	56	73	67	90	65
<i>S. flexneri</i>	47	39	54	58	50
<i>S. boydii</i>	20	8	19	10	13
<i>S. dysenteriae</i>	4	5	5	7	4
<i>Shigella</i> art ukjent	3		4		6
Totalt	130	125	149	165	138

Tabell 1-3. Shigellose i Norge meldt MSIS 2002-2006 etter diagnoseår og smittested (13).

Smittested	2002	2003	2004	2005	2006
Norge	13	11	27	11	26
Utlandet totalt	115	114	116	152	111
<i>Europa</i>	14	12	9	7	
<i>Asia</i>	40	35	39	45	
<i>Afrika</i>	48	49	59	78	55
<i>Sør- og Mellom-Amerika</i>	8	13	6	15	9
<i>Nord-Amerika</i>	5	4	1	3	1
<i>Andre / ukjent</i>		1	2	4	1
Ukjent	2		6	2	1
Totalt	130	125	149	165	138

Det årlige antall tilfeller av shigellose i verden er estimert til 164,7 millioner, hvorav 163,2 millioner finner sted i u-land (3,5 % av populasjonen i u-land) og 1,5 millioner i i-land (0,1 % av populasjonen i i-land). I u-land dør 1,1 millioner mennesker (0,7 % av de infiserte) av shigellose. Barn under 5 år i u-land er de som rammes verst, de utgjør 69 % av de infiserte tilfellene og 61 % av dødsfallene. *Shigella* forårsaker 5-10 % av diaré sykdommer, men utgjør hele 75 % av diarédødsfallene. Av tabell 1-4. kommer det frem at *S. sonnei* er vanligst i i-land, mens *S. flexneri* er den vanligste av *Shigella* sp. i u-land.

Tabell 1-4. Median prosentvis fordeling av shigellose etter *Shigella* artene i i-land og u-land.

	<i>S. sonnei</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. dysenteriae</i>
I-land	77 %	16 %	2 %	1 %
U-land	15 %	60 %	6 %	6 %*

*30 % av *S. dysenteriae* tilfellene er type 1

Siden 1970-tallet har det i u-land vært stort fokus på rehydrering med elektrolytter og vann ved diaré sykdom. Dette har vært en svært effektiv strategi og gitt redusert dødelighet ved diaré sykdom. Denne behandlingen er ikke nok (se avsnitt 1.1.9) ved dysenteri ettersom *Shigella* er en mukosainvaderende bakterie (se figur 1-1.). Derfor har dysenteri tatt over for vandig diaré som en av de viktigste dødsårsakene blant barn i u-land (16).

1.1.8. Forebygging

Selv om det kun kreves et fåtall organismer for å utvikle sykdom, reduseres innsidensen av sykdom betraktelig ved enkel håndvask med såpe og vann etter toalettbesøk og før måltid. Amming av spedbarn reduserer risikoen for shigellainfeksjon i forhold til mating med flaske (2;25). Det finnes ingen vaksine, men det har lenge vært arbeidet med å utvikle en shigellavaksine. En vaksine vil være svært nyttig pga økende antibiotikaresistens, det høye antall smittede og for reisende til områder med mye *Shigella*. Immunitet til *Shigella* infeksjon er serotype spesifikk, dvs rettet mot LPS O-antigenet. Ny smitte med en annen serotype er mulig. En vaksine som beskytter mot alle fire arter av *Shigella* vil derfor være den beste løsningen (6;15).

1.1.9. Behandling og resistens

Rehydrering er viktig, men ikke like effektivt som ved sykdom forårsaket av non-invaderende patogener som *Vibrio cholera* og enterotoksigene *E. coli* (ETEC) (6). I følge WHO sine retningslinjer skal alle tilfeller av blodig diaré behandles med antibiotika (26). Antibiotika reduserer sykdommens alvorlighetsgrad og forkorter tiden for smittsomhet. I Norge gis det ciprofloksacin i fem dager til voksne, til barn benyttes det trimetoprim–sulfametoksazol om det er følsomhet for disse. Tarmmotilitetsmidler er absolutt kontraindisert ved blodig diaré, da slike legemidler kan forlenge sykdommen.(13;17;27).

Antimikrobiell resistens for behandling av shigellose er et stort problem i både i-land og u-land, derfor velges det av og til kun å behandle de mest alvorlige tilfellene. Dyre legemidler har ofte vært siste utvei for behandling, noe som ikke alle i u-land har hatt råd til. Til barn har det blitt brukt legemidler som ikke var godkjent for bruk til barn. Plasmid mediert resistens til antibiotika ble først oppdaget i *Shigella*, overføringen av resistens mellom *Shigella* og andre Enterobacteriae i tarmen kan være årsaken til at antimikrobiell resistens er så vanlig også for nye antibiotika. En annen årsak til resistens kan være rask og sterk seleksjon under epidemier, dvs. kun de stammene som overlever antibiotikabehandlingene er igjen for å spre sykdommen videre (2;16;21).

1.2. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA)

1.2.1. Bakgrunn

I løpet av de siste årene har det humane genom og svært mange patogene bakteriers genom blitt sekvensert. I mennesket består kun ca. 3 % av genomet av gener som koder alle nødvendige proteiner for celledfunksjon. I bakterier er andelen kodende gener over 90 %. Resten av DNAet i eukaryoter består for det meste av repeterte sekvenser. Det har vist seg at bakteriers DNA, akkurat som eukaryoters DNA, også består av en høy prosentandel repetert DNA (28;29). DNA repetisjonene kan være samlet på et bestemt sted eller være spredt gjennom hele genomet. Repetisjonsenheter kan være identiske (homologe) eller variere i sine sekvenser ved punktmutasjoner (heterogene). Punktmutasjoner gir degenererte repetisjoner, dette er vanlig blant lengre repetisjoner. Direkte repetisjoner består av sekvensenheter rett etter hverandre - tandemrepetisjoner. Bestemte områder med naboliggende repetisjonsenheter på et locus kalles ”variable number of tandem repeat” (VNTR) områder. Når repetisjonsenheter er korte (under 25 nukleotider) kalles de også ”short sequence repeats” (SSRs).

Antall repetisjonsenheter på et bestemt locus varierer som oftest mellom ulike bakteriellstammer og er en veldokumentert stammedefinerende parameter. Ettersom disse tandemrepetisjonsenheter er identiske er det enkelt å introdusere eller slette en repetisjonsenhet, pga avvikende baseparring (”slipped strand mispairing”) eller ved rekombinasjon mellom homologe repetisjoner (30;31). Lengre tandemrepetisjoner fører til høyere mutasjoner i baseparringen pga ustabilitet, dette gjør lengre tandemrepetisjoner relativt uvanlig. Lengden på repetisjonsenheter i tandemrepetisjonene har også betydning, jo kortere repetisjonsenhet desto høyere mutasjonshastighet. Mutasjonshastigheten øker også med perfekte homologe repetisjoner (32). Bakterier i et skadelig miljø vil indusere overlevelsesmekanismer som undertrykker DNA reparasjon, som gir enda mer variasjon i VNTR områdene. Noen bakterier benytter også variasjoner i tandemrepetisjoner til å skape variasjoner i proteiner som uttrykkes på bakteriens overflate for å unngå vertens immunforsvar. Disse områdene kalles ”contingency loci” (28).

De polymorfe egenskapene til VNTR områdene har kommet til nytte for identifikasjon av både mennesker og bakterier, noe som har gitt opphav til metoden som kalles ”DNA fingerprinting” eller ”multiple-locus variable number tandem repeat analysis” (MLVA) (29).

Opprinnelig ble allelene til VNTR loci benyttet til rettmedisinsk analyser av mennesker. Eksempler på analyser er farskapstesting og DNA identifikasjon ved kriminelle handlinger (33;34).

1.2.2. MLVA typing av bakterier

Mye av det tidlige arbeidet med å utvikle MLVA metoder for bakterier, ble utført for bioterror relaterte mikroorganismer som *Bacillus anthracis*. *B. anthracis* er kjent for å ha et svært lite polymorft genom, det har ført til vanskeligheter med å differensiere ulike stammer. Ved hjelp av polymorfe VNTR loci var det mulig å differensiere ulike stammer av denne bakterien under anthrax utbruddet i USA i 2001. MLVA metoden viste at alle 135 anthraxtilfellene hadde samme kilde og sykdomstilfellene kom av bioterror. MLVA er nå en standardisert metode for genotyping av *B. anthracis* isolater (28;35-37).

MLVA-typing differensierer mellom ulike bakterieisolater innenfor en bakterieart, slik at hvert bakterieisolat får en unik MLVA profil. Det er derfor gunstig med høye mutasjonshastigheter for tandemrepetisjonene i MLVA-typing, da det gir god separasjon av bakterieisolatene. Alle bakterier er ikke like mottagelige for MLVA typing, derfor må bakteriens MLVA potensialet evalueres (38). Reproduserbarhet og stabilitet kan undersøkes ved å utføre re-typing av bakterieisolater og omsåing av noen isolater over lengre tid for å se om MLVA profilene endrer seg (28). Ustabile VNTR loci har ført til forviklinger tidligere, da samme bakterieklon har ført til utbrudd med flere enn en MLVA profil. Felles for studiene var at utbruddsprofilene var "single-locus varianter" (SLV), det betyr at MLVA profilene var ulike på ett locus. For disse studiene ble det besluttet å inkludere MLVA profiler med variasjoner på ett locus i samme utbruddsprofil (32;39).

1.2.3. Harmonisering av MLVA data

Standardiserte MLVA data kan utveksles mellom laboratorier. En stamme beskrives enten med et tall for hver repetisjonsenhet eller med allelstørrelsen uttrykket i basepar. Hver unike variant av VNTR locus er et allel. Diversitet måles ut ifra antall ulike alleler på et locus for en art etter "Simpson's index of diversity". Dette er en måling som gir samme tyngde til alle allelene. Alleler som kun er forskjellige med en repetisjonsenhet regnes ikke for å være evolusjonært nærmere i slektenskap enn de allelene som varierer med mange repetisjonsenheter.

Disse antagelsene om likhet og slektskap er ikke alltid riktig, men er med på å standardisere MLVA metoden (38).

1.2.4. IS-elementer (Insertion Sequence)

IS-elementer er korte DNA sekvenser som fungerer som enkle transposable elementer. De har gener som koder for enzymet transposase, som er nødvendig for transposisjonen. Det er de korte inverterte terminale repetisjonene på IS-elementene som fører til transposisjonen (19;29). IS-elementer er en type mobile genetiske elementer som kan dukke opp i en MLVA-analyse.

1.2.5. MLVA database

Det finnes en database over tandemrepetisjoner i flere fullstendig sekvenserte genom. Disse sekvensene er mulig å hente opp fra web adressen: <http://minisatellites.u-psud.fr/> . Databasen er en ressurs for videre arbeid med utvikling av nye MLVA-metoder for typing av flere bakterier (28). En ny internasjonal database med MLVA-profiler fra alle land er snart på vei, på denne måten kan MLVA profiler fra hele verden samles i denne databasen (40).

1.3. Pulse-field gelelektroforese - PFGE

Pulse-field gelelektroforese er en av de mest anvendte metodene til epidemiologiske studier, utbrudd og overvåking (41). Det er derfor naturlig å sammenligne PFGE med MLVA. PFGE er en gentotypisk analysemetode som kan anvendes til epidemiologisk studier for å skille og sammenligne bakteriestammer. Metoden brukes som et supplement til tradisjonelle fenotypiske metoder som serotyping og biokjemiske metoder. PFGE benyttes til å sammenligne bakterieisolater fra pasienter og mulige smittekilder ved sykdomsutbrudd. Ved sykdomsutbrudd kan PFGE brukes til å karakterisere utbruddstammen, bestemme omfanget av utbruddet og identifisere smittekilden. PFGE kan også benyttes til å kartlegge og overvåke bestemte bakterier.

Metoden baserer seg på DNA isolering, kutting av DNA med restriksjonsenzymmer og separasjon av DNA-fragmentene med gelelektroforese (42). Med restriksjonsenzymmer blir DNA kuttet på kun få bestemte steder, slik at resultatet blir store fragmenter som ikke lar seg skille med vanlig gelelektroforese (19). DNA-fragmentene er større enn porene i

agarosegelen, og for at de skal kunne bevege seg i gelen må molekylene strekkes ut. Ved pulsfelt gelelektroforese er DNA-fragmentene pålagt en strømstyrke som endrer retning etter en bestemt tid (pulstid). På denne måten rettes molekylene ut og tvinges på skrå i retningen av anoden før de vandrer videre nedover gelen. Prosessen repeteres slik at molekylet beveger seg i sikk-sakk langs gelen (43). PFGE kan anvendes på alle Enterobacteriaceae, men metodens evne til å differensiere mellom isolatene varierer avhengig av bakterieart. Det er mulig å separere DNA fragmenter på størrelser mellom 20 kbp og 5000 kbp.

1.4. Utbruddsoppløring og sykdomsovervåking

1.4.1. Nasjonalt referanselaboratorium ved FHI – Bidrar til å oppdage og oppklare utbrudd.

Det primære formålet med referansefunksjonen er å foreta en samlet, nasjonal overvåking av næringsmiddelbårne bakterier og av egenskapene til disse bakteriene. Dette er en oppgave FHI forvalter på vegne av helsemyndighetene, og som er nødvendig for overvåking, forebygging og bekjempelse av epidemiologisk viktige infeksjonssykdommer.

Alle landets mikrobiologiske laboratorier sender rutinemessig mikroorganismer isolert fra pasienter til Referanselaboratoriet ved FHI, uansett om det foreligger utbrudd eller ikke. Sammen med mikroorganismene sendes det også nødvendige epidemiologiske opplysninger. Avdelingens mikrobiologiske overvåking omfatter også næringsmidler, dyr og andre kilder under Mattilsynets forvaltningsområdet. Dette samarbeidet med Mattilsynet gjør det mulig å foreta en total overvåking av næringsmiddelbårne bakterier fra alle kilder. Gjennom dette arbeidet er det mulig å oppdage og oppklare sykdomsutbrudd, identifisere smittereservoir og smitekilder, og følge med på bakterienes utviklingstendenser.

Referanselaboratoriet utfører verifisering, typing og karakterisering av bakteriene. Resultatene formidles til rekvirerende laboratorium, dette bidrar til at primærlaboratoriene blir kvalitetssikret og pasientene får riktig diagnose (44). Resultatene formidles også til MSIS, slik at alle som ønsker kan hente ut statistikk over meldingspliktige smittsomme sykdommer i Norge (45). Dersom referanselaboratoriet innenfor et bestemt tidsrom får flere bakterieprøver av en bakterieart enn forventet (det endemiske nivået) vil det foreligge mistanke om utbrudd. Det mistenkes også utbrudd ved to eller flere tilfeller av samme sykdom som antas å ha

samme kilde. Ved utbrudd formuleres det hypoteser om smittekilder ved hjelp av data fra avdelingens overvåkningsregistre. De sykdomsfremkallende bakterieisolatene vil bli typet med epidemiologiske markøranalyser for å undersøke om isolatene er identiske.

Epidemiologiske markøranalyser omfatter fenotypiske analyser, genotypiske analyser og virotypiske analyser. Fenotypiske analyser vil være serotyping, biotyping, fagtyping og karakterisering av resistensmønstre. Genotypiske analyser er basert på mikrobenes arvestoff, dvs. DNA- eller RNA-profiler. Virotypiske analyser utføres ved påvisning av gener som koder for virulensegenskalper (19;46).

1.4.2. Utbruddsoppløsing og sykdomsovervåking med MLVA

MLVA er en genotypisk analysemetode. Ved å samle et bibliotek av MLVA-profiler, som skiller godt mellom bakterieisolatene vil man raskt kunne identifisere en sykdomsfremkallende bakterieisolat under rutinetesting av bakterieprøver (47). Har bakterieisolatene ulike MLVA-profiler ser man på sykdomstilfellene som tilfeldige, men dersom MLVA profilene er identiske vurderes det som et utbrudd. Avdeling for infeksjonsovervåking ved FHI vil sammen med Mattilsynet umiddelbart sette i gang omfattende intervjuer av pasientene og deres familie for å spore smittekilden. Det vil bli tatt prøver av mulige smittekilder for å utprøve hypotesene ved å sammenligne med den sykdomsfremkallende bakterien, og med avdelingens stammesamlinger og registre. Ved identisk MLVA-profil av bakterieisolatet fra pasient og mistenkt smittekilde, vil man ha funnet kilden til utbruddet. Mattilsynet sørger raskt for salgsstopp og tilbaketrekking av eventuelle matprodukter. Oppklaringen av utbrudd er fullstendig når forebyggende tiltak er satt i verk, og det er kontrollert om disse følges opp på en effektiv måte (46).

1.5. MLVA metodeutvikling

For å utnytte VNTR loci til å differensiere de ulike *Shigella* stammene er det først nødvendig å finne disse DNA sekvensene i genomet til bakterien. En genotypisk analysemetode som MLVA er, krever at VNTR sekvensene amplifiseres ved hjelp av PCR (28). For PCR må det konstrueres "forward" og "revers" primerer til flankene av hvert VNTR locus (se 3.4.1). Primere er nødvendig for DNA polymerasen som kun kan syntetisere en ny DNA tråd fra en allerede eksisterende 3'-OH ende av en DNA sekvens (48). Det er ikke sikkert at alle primerene er i stand til å gi amplifiserte VNTR sekvenser, derfor er det først viktig å

undersøke om primerene fungerer i praksis. For å gjøre metoden hurtig og enkel er det ønskelig å tilsette alle primerene i samme reaksjon, slik at det blir en PCR multipleks. På denne måten blir alle VNTR sekvensene amplifiseres i samme reaksjon (49). Ved å blande alle primerene i en reaksjon kan det oppstå kompatibilitetsproblemer som gir uklare resultater. Fargevalg for de ulike primerene kan også by på problemer, ettersom det er over dobbelt så mange primersett som mulige farger til å merke dem med (se 3.6.2.). Fargevalget er viktig for god separasjon og riktig identifikasjon av PCR multipleks produktene på kapillærelektroforesen (50). Sekvensering av PCR produktene er nødvendig for å verifisere at ulike baseparstørrelser av PCR produktene faktisk skyldes polymorfe VNTR loci. VNTR loci stabilitet og MLVA metodens reproduserbarhet må alltid undersøkes (51).

1.6. Problemstilling og hensikt med oppgaven

1.6.1 Problemstilling

- Er de konstruerte primerene i stand til å binde seg i et utvalg av *Shigella* sp.?
- Hvordan skal primerene farges med tre farger uten at det blir misforståelser om hvilke primere som gir hvilke produkter?
- Skyldes de varierende baseparstørrelsene av PCR produktene virkelig polymorfe VNTR loci, eller er det andre faktorer som IS elementer som gir DNA fragmenter av ulik størrelse?
- Hvor god locusdiversitet har primerene, og skiller MLVA-*Shigella* metode godt nok innenfor *Shigella* sp.?
- Gir MLVA-*Shigella* metode reproduserbare resultater og er de valgte VNTR loci stabile?
- Er en MLVA-*Shigella* metode nyttig?

1.6.2. Hensikt med oppgaven

Hensikten med oppgaven var å utvikle en ny MLVA metode for raskt å identifisere og spore *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii* og *S. dysenteriae* til utbruddsoppklaring og sykdomsovervåking.

2. Materialer

Tabell 2-1. Primere fra Operon Biotechnologies GmbH, Tyskland, til utprøving av *Shigella* MLVA metoden.

Primernavn	Primersekvens 5' til 3'
SHTR1-forward	[5HEX]CTGGGGAACGCTGAAAAATGAGA*
SHTR1-reverse	GCCAGCTGTGCGGAATGTAATG
SHTR2-forward	[6~FAM]TTATGGCCGACTGGGAGATGA*
SHTR2-reverse	TTCGGCAACTAAAGCGTCGTA
SHTR3-forward	[5TET]ATGGCCACAGACAGGTAAAAGACG*
SHTR3-reverse	ATACAGCAGCGGCAACACTACGAC
SHTR4-forward	[5HEX]TCCCCGCAATCAGCAAAACAAAGA*
SHTR4-reverse	CACAACCGGCAGCAGGGACAA
SHTR5-forward	[5TET]AACGGCTGGGAATAATCGCTAACA*
SHTR5-reverse	CGCAACCCGCCCATCAG
SHTR6-forward	GTCGGGGCTATATTGGAAGAACAC
SHTR6-reverse	TTGAGAAAGGGCAGGGATAGTAGC
SHTR7-forward	[6~FAM]TCCCGCGATGAGACTAA*
SHTR7-reverse	AATATTGTTCGCTTTGGAGAG
SHTR8-forward	[5TET]GCGAGGCGATGGGCTTTTCTG*
SHTR8-reverse	CGCGCCGTTGTTGGAGTTGTTC

*Fluorescencemerkede primere ble benyttet på ABI 310. Eneste forskjell mellom merkede og umerkede primere er fargen i parentes.

Tabell 2-2. Bakteriestammer (20 stk), brukt til å utprøve primersett parvis.

DNA nr.	Stammenr.	Bakterie
A46	1020-6332	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 2
A47	1030-3917	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 2
A48	1104-0364	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 3
A49	1104-0546	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 3
A50	1104-3126	<i>Shigella dysenteriae</i> serotype 4
A51	1104-3332	<i>Shigella sonnei</i>
A52	1104-3345	<i>Shigella sonnei</i>
A53	1104-3402	<i>Shigella sonnei</i>
A54	1104-3403	<i>Shigella sonnei</i>
A55	1104-3422	<i>Shigella sonnei</i>
A56	1104-1675	<i>Shigella boydii</i> serotype 2
A57	1104-1869	<i>Shigella boydii</i> serotype 13
A58	1104-1955	<i>Shigella boydii</i> serotype 2
A59	1104-3039	<i>Shigella boydii</i> serotype 4
A60	1104-3288	<i>Shigella boydii</i> serotype 2
A61	1104-3200	<i>Shigella flexneri</i> serotype 3
A62	1104-3238	<i>Shigella flexneri</i> serotype 1
A63	1104-3270	<i>Shigella flexneri</i> serotype 6
A64	1104-3372	<i>Shigella flexneri</i> serotype 2
A65	1104-3404	<i>Shigella flexneri</i> serotype 5

Tabell 2-3. Oversikt over utstyr benyttet i hovedoppgaven

Utstyr	Leverandør
BioRobot	QIAGEN BioRobot EZ1
PCR-maskin	Applied-Biosystems GeneAmp® PCR System 9700
Gelelektroforeseapparat	Amersham Pharmacia Biotech, USA
FlashGel System	Cambrex Bio Science Rockland, USA
BioRad GelDoc 2000	BioRad, USA
Agilent 2100 BioAnalyser expert	Agilent Technologies, USA
NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies, USA
ABI 310	Applied Biosystems, USA
ABI 3130 XL	Applied Biosystems, USA

Tabell 2-4. Oversikt over produkter benyttet i hovedoppgaven

Produkt	Leverandør
PBS	FHI-Substratlaboriet
EZ1 DNA Tissue kit, 951034	Qiagen, GmbH, Tyskland
1 X TE-buffer, Sigma T9285, pH 7*	Sigma, USA
Sterilt vann	FHI-Substratlaboriet
2 X Qiagen Multiplex PCR Master Mix*	Qiagen, GmbH, Tyskland
Agarose SeaKem LE, 50004*	Cambrex Bio Science Rockland, USA
5 X TBE-buffer pH 8*	FHI-Substratlaboriet
Deionisert vann	FHI-Substratlaboriet
Stop mix (gel loading buffer)*	FHI-Substratlaboriet
5 X Nucleic Acid Sample Loading Buffer*	Bio-Rad Laboratories, USA
EZ Load 100 bp DNA Molecular Ruler, 170-8352*	Bio-Rad Laboratories, USA
EZ Load 500 bp DNA Molecular Ruler, 170-8354*	Bio-Rad Laboratories, USA
EZ Load Precision DNA Molecular Mass, 170-8356*	Bio-Rad Laboratories, USA
Ethidium Bromid 0,625 mg/ml, 16102-250*	VWR, USA
EDTA*	Applied Biosystems, USA
POP 4 / 310 Genetic Analyzer POP	Applied Biosystems, USA
HiDi formamid	Applied Biosystems, USA
Geneflo 625 DNA Ladder, TAMRA Labeled	EURx Ltd, Polen
POP7	Applied Biosystems, USA
Stikkagar 1 %*	FHI-Substratlaboriet
Laktoseagar*	FHI-Substratlaboriet / Biolife
Hjertebuljong	SSI, Danmark

* Se vedlegg 1 for sammensetning av produkter.

3. Metoder

3.1. Primerdesign

3.1.1. Prinsipp

Tre ulike dataprogram, Tandem Repeats Finder (Referanse), Kodon (Applied-Maths) og GeneQuest (DNASTAR), ble benyttet til å søke etter tandemrepetisjonsområder i genomsekvensene til de fullsekvenserte *Shigella* stammene *Shigella sonnei* Ss046 (GenBank aksessnr: NC_007384), *Shigella boydii* Sb227 (GenBank aksessnr: NC_007613), *Shigella dysenteriae* Sd197 (GenBank aksessnr: NC_007606), *Shigella flexneri* 2a str. 2457T (GenBank aksessnr: NC_004741) og *Shigella flexneri* 2a str. 301 (GenBank aksessnr: NC_004337). Flankeregionene av de oppdagede VNTR områdene ble kopiert, og det ble konstruert PCR-primere så nærme VNTR områdene som mulig med programmet PrimerSelect (DNASTAR). De valgte primerene ble undersøkt for match i *Shigella* genomene nevnt ovenfor ved hjelp av Kodon og online søk (NCBI BLAST for short nearly identical sequences), og plassering av primerene ble optimalisert i programmet Kodon. Deretter ble de teoretiske PCR produktene sammenlignet i programmet MegAlign (DNASTAR) som også utførte online søk for matchende PCR-produkt sekvenser. Det er ønskelig å finne loci med tandemrepetisjoner i flest mulig stammer, for å få en best mulig oppløslighet på MLVA metoden. (52). Til bruk i denne metoden ble det funnet åtte genomiske VNTR loci (se tabell 3-1.).

Tabell 3-1. Informasjon om VNTR locus.

Locus	Opprinnelse	Repetisjon (x antall)	Assosiert gen
SHTR1	<i>S. sonnei</i>	ATGCGCC (x10.3)	<i>hdhA</i>
SHTR2	<i>S. sonnei</i>	CATTCAA (x14.3)	<i>yhaV</i>
SHTR3	<i>S. boydii</i>	TTGATG (x10.3)	<i>yhdW</i>
SHTR4	<i>S. boydii</i>	GGTGCA (x9.5)	<i>hemY-X</i>
SHTR5	<i>S. dysenteriae</i>	TGTTGTAGC (x15.2)	<i>ybeF</i>
SHTR6	<i>S. dysenteriae</i>	ACCAATC (x7.1)	Intergenisk sekv.
SHTR7	<i>S. flexneri</i>	TTAATGATT (x12.2)	Intergenisk sekv.
SHTR8	<i>S. flexneri</i>	GTTGCTG (x8)	Intergenisk sekv.

3.2. Bakterieisolater

Bakterieprøver fra mennesker og dyr fra tiår tilbake er lagret på Referanselaboratoriet (se innledning for nærmere beskrivelse) ved FHI etter stamme nr. Året bakterien ble isolert kan bestemmes ut ifra stamme nr. For eksempel vil stamme 1106-1111 være isolert i 2006 og stamme 1020-1111 isolert i 2000. Referanselaboratoriet har også lagret en del epidemiologiske opplysninger som pasientens smittested og bosted (44). Denne informasjonen ble brukt til å velge humane *Shigella* prøver med mest mulig ulike opprinnelsesland og bosted.

3.3. Isolering av DNA

Alt arbeid med levende bakterier foregikk i sikkerhetsbenk med gul frakk og hansker. *Shigella* sp. og *Escherichia.coli* ble sådd ut fra stikkagar til laktosekåler og inkubert ved 35 °C over natt. Dersom det ikke ble vekst på laktoseskålene ble 1 ml hjertebuljong tilsatt stikkagaren og inkubert ved 35 °C over natt. Fra laktoseskålene ble det overført en øse (1 µl) kolonier til isolering av DNA og en øse kolonier til nye stikkagarer. De nye stikkagarene ble inkubert ved 35 °C over natt. Dagen etter ble stikkagartoppene dyppet i smeltet voks slik at lokkene forble tette. Stikkagarene ble lagret i romtemperatur.

3.3.1. Isolering av DNA ved koking

En øse bakteriekolonier ble slemmet opp i 300 µl sterilt vann i et eppendorfrørene (1,5 ml). Løsningen ble kokt i 15 min, deretter ble rørene sentrifugert i 1 min på 1300 rpm. Supernatanten på 250 µl ble isolert, tildelt et DNA nr og frosset ved 20°C på Bakteriologisk avdeling.

3.3.2. Isolering av DNA med BioRobot

3.3.2.1. Prinsipp

Bakteriene lyses av proteinkinase K og magnetiske partikler tilsettes prøven. DNA bindes til silicaoverflaten til de magnetiske partiklene i nærvær av et chaotropisk salt. Det chaotropiske saltet bryter molekylære bindinger, slik at partiklene med DNA kan separeres fra lysatet med en magnet. DNAet blir deretter eluert ut i elueringsbuffer.

3.3.2.2. Utførelse

BioRoboten ble brukt med EZ1 DNA Tissue kit, som isolerte DNA fra 6 prøver om gangen. En øse kolonier ble slemmet opp i 200 µl PBS i et sarstedtrør (2 ml). Deretter ble produsentens protokoll fulgt.

3.4. PCR – Polymerase kjedereaksjon

3.4.1. Prinsipp

PCR er basisen til de fleste molekylærbiologiske metoder i dag (53). Ved PCR amplifiseres bestemte DNA fragmenter *in vitro* i et stort antall kopier. Til dette brukes spesifikke forward og revers primere, enzymet Taq polymerase og en blanding av deoksyribonukleotider (dNTP). Det er nødvendig å kjenne DNA sekvensen på områdene før og etter fragmentet som skal amplifiseres, for å konstruere komplementære primere til disse områdene. De amplifiserte DNA fragmentene kan blant annet separeres på agarosegel og kapillærelektroforese. På agarosegel må de separerte DNA fragmentene gjøres synlig med etidiumbromid (EtBr), deretter kan de detekteres under UV-bestråling. Slik kan man raskt se om det ønskede fragmentet er til stedet eller ikke, og samtidig bestemme ca. baseparstørrelsen til PCR produktet. Dersom man ønsker å bestemme størrelsen til PCR produktet mer eksakt kan produktet separeres ved kapillærelektroforese (43).

Det er tre hovedsteg i en PCR syklus, som repeteres ca. 30 ganger:

1. Denaturering ved 95°C:

Under denatureringen åpnes den doble DNA heliksen til to enkeltrådet DNA. Alle enzymreaksjoner stopper, for eksempel forlengelser fra forrige runde.

2. Hybridisering (annealing) ved 55°C-60°C:

Ettersom primerene er komplementære til DNA tråden, på begge sider av den ønskede DNA sekvensen, vil primerene bindes her. Siden primerene er i overskudd vil de bindes alle DNA fragmentene. Hvis hybridiseringstemperaturen blir for lav, kan primerene bindes til hverandre eller et annet området på DNAet, selv om de ikke er helt komplementære (uspesifikk binding).

3. Forlengelse ved 72°C:

Dette er den ideelle arbeidstemperaturen for polymerasen. Polymerasen forlenger de primerene som har en sterk ionisk binding til DNA templatene under hybridiseringen. Forlengelsen skjer ved at polymerasen tilsetter dNTP på primerens 3' side (29).

3.4.2. Utførelse

Primerene (se tabell 2-1) ble løst i TE-buffer (mengde oppgitt fra produsent) og videre fortynnet i sterilt vann. Det ble utført PCR reaksjoner med alle primersettene parvis for de valgte bakteriene (se tabell 2-2), for å undersøke om primersettene var i stand til å binde seg og gi produkt eller ikke (se figur 3-1 og tabell 3-2). Senere ble primerparene blandet til en PCR multipleks (se tabell 3-3. og 3-4.). Alt arbeid med primere foregikk på sterilrom kun beregnet til arbeid med PCR, hvor DNA ikke ble brakt inn.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A46	A47	A48	A49	A50	A51	A52	A53	A54	A55	A56	A57
B	A46	A47	A48	A49	A50	A51	A52	A53	A54	A55	A56	A57
C	A46	A47	A48	A49	A50	A51	A52	A53	A54	A55	A56	A57
D	A46	A47	A48	A49	A50	A51	A52	A53	A54	A55	A56	A57
E	A46	A47	A48	A49	A50	A51	A52	A53	A54	A55	A56	A57
F	A46	A47	A48	A49	A50	A51	A52	A53	A54	A55	A56	A57
G	A46	A47	A48	A49	A50	A51	A52	A53	A54	A55	A56	A57
H	A46	A47	A48	A49	A50	A51	A52	A53	A54	A55	A56	A57

	SHTR1
	SHTR2
	SHTR3
	SHTR4
	SHTR5
	SHTR6
	SHTR7
	SHTR8

Figur 3-1. Oversikt over et PCR oppsett til utprøving av primersett. De ulike fargene representerer ulike primersett, de ulike tallene i de fargede rubrikkene viser bakterienes DNA nummer. Ettersom et primersett skulle benyttes til så mange prøver, ble det gjort i stand primerblandinger for de enkelte primerparene i sterile eppendorfrør som det ble alliquotert ut til PCR stripsene.

Tabell 3-2. Oversikt over PCR oppsett for en enkelt prøve

	µl per prøve	µl per prøve
2 x Master Mix*	12,5	25
H ₂ O	9,5	21
Forward (merket**) primer, 10 µM	0,5	1
Reverse primer, 10 µM	0,5	1
DNA	2	2
Sum	25	50

*se vedlegg 1 for sammensetning.

** merkede primere ble kun benyttet til ABI 310.

Tabell 3-3. Oversikt over PCR multipleks for utprøving av MLVA-*Shigella* metoden.

	µl per prøve	µl per prøve
2 x Master Mix	12,5	25
H ₂ O	3,5	9
Forward merket primer, 10 µM	0,5 (x7=3,5)	1 (x7=7)
Reverse primer, 10 µM	0,5 (x7=3,5)	1 (x7=7)
DNA	2	2
Sum	25	50

Tabell 3-4. Oversikt over PCR multipleks for MLVA-*Shigella* metoden.

	µl per prøve	µl per prøve
2 x Master Mix	12,5	25
H ₂ O	4,5	11
Forward merket primer, 10 µM	0,5 (x6=3)	1 (x6=6)
Reverse primer, 10 µM	0,5 (x6=3)	1 (x6=6)
DNA	2	2
Sum	25	50

DNA ble amplifisert med programmet 60°C annealing ved hjelp av temperatursyklusene vist i tabell 3-5. (annealingstemperaturen er uthevet). Under utprøving av primersettene ble de prøvene som ikke ga bånd eller ga svakt bånd på agarosegel også forsøkt med programmet 55°C annealing på PCR-maskinen.

Tabell 3-5. Oversikt over temperatursykluser i PCR reaksjonene.

95°C 15 min	} 30 sykluser	95°C 15 min	} 30 sykluser
94°C 30 sek		94°C 30 sek	
60°C 1 min 30 sek		55°C 1 min 30 sek	
72°C 1 min 30 sek		72°C 1 min 30 sek	
72°C 10 min		72°C 10 min	
4°C HOLD		4°C HOLD	

3.5. Agarose gelelektroforese

3.5.1. Prinsipp

Agarose er et naturlig linært polysakkarid. Ved agarose gelelektroforese separeres molekyler etter ladning og størrelse i et elektrisk felt. DNA er negativt ladet og vil derfor vandre mot positiv pol (anoden). DNA fragmentene vil kunne separeres etter størrelse, da de minste fragmentene vandrer fortere og derfor lenger enn de større. Med agarosegel kan man selv bestemme porestørrelse ved å velge høyere konsentrasjon og dermed bedre separasjonen. For å måle baseparstørrelsen til DNA fragmentet må det appliseres en kjent DNA markør som 100 basepar og/eller 500 basepar DNA ladder.

For å kunne se og fotograferer gelen må den farges med EtBr og avfarges i vann for å fjerne overflødig EtBr. EtBr er et mutagent fluorescerende fargestoff som setter seg mellom to DNA basepar og dytter de fra hverandre (29). Dette komplekset blir synlig ved UV-bestråling og kan da fotograferes.

3.5.2. Utførelse

3.5.2.1. Agarosegel 1 %

1,5 g agarosepulver ble veid på veiebeger og overført til erlenmeyerkolbe. 150 ml 0,5 x TBE buffer ble målt i målesylinder og tilsatt agarosepulveret. Dette ble satt til koking i mikrobølgeovn til alt var oppløst. EM-kolben var i vannbad (56 °C) i 15 min for å få riktig temperatur. Gelformen ble teipet med autoklavteip på begge ender slik at agarosegelen ikke skulle renne av. Kammer ble benyttet for å lage brønner for tilsetting av PCR produktene. Agaroseløsningen ble helt over i gelformen, og fikk stivne i 30 min. Gelelektroforeseapparatet ble fylt med 2 l 0,5 x TBE buffer. Da gelen var klar, ble kammenene og teipen fjernet, og overført til gelkaret. 10 µl av PCR produkt ble tilsatt 2 µl 5 x Sample Loading Buffer eller 3 µl stopp mix for 10 µl PCR produkt. 10 µl av denne blandingen og 8 µl av DNA markørene ble applisert på gel.

	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
100bp	A46	A46	A46	A46	A46	A46	A46	A46	500bp	A47	A47	A47	A47	A47	A47	A47	A47	500bp
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	
100bp	A48	A48	A48	A48	A48	A48	A48	A48	500bp	A49	A49	A49	A49	A49	A49	A49	A49	500bp

Figur 3-2. Oversikt over applisering på gel. Den fargerike kolonnen er brønner. Ulike farger indikerer ulike primersett. I brønnene med tall over er det tilsatt PCR prøver for separasjon, disse sammenlignes med både 100 basepar og 500 basepar DNA markører.

Figur 3-2., viser et eksempel på gelapplisering. Gelen med 22 brønner oppe og 22 brønner nede ble kjørt på 120 V i 1-2 timer. Under elektroforesen var det vannkjøler på for å holde temperaturen konstant. Gelen ble farget i EtBr bad i 30 min og avfarget i destillert vann i 15-30 min for å fjerne overflødig EtBr, deretter ble gelen fotografert på GelDoc som har innebygd UV-lys.

3.5.2.2. Agarosegel 1 % - mindre gelform

En mindre gelform med 8 kammer / brønner ble også benyttet når færre enn 8 prøver skulle analyseres. Da ble samme mengde agaroseløsning gjort i stand, men kun ca. 50 ml benyttet per gang. Restene ble lagret på erlenmeyerkolbe og kokt opp i mikrobølgeovn når det ble behov for ny gelkjøring. Samme mengde PCR produkt og DNA markør som på større gel ble applisert. Et mindre gelelektroforeseapparat ble tilsatt 300 ml 0,5 x TBE-bufferløsning og 25 µl EtBr før gelen ble kjørt på 100 V i 1 time uten vannkjøler. Gelen ble fotografert på GelDoc.

3.5.2.3. Separasjon av PCR produkt på FlashGel 1.2 %

FlashGel System Quick Start Guide instruksjoner fra produsent ble fulgt. Mengde prøve per brønn kunne ikke overskride 5 µl. FlashGelen har totalt 13 brønner som alle ble tilsatt 7 µl sterilt vann. Mengde PCR produkt som ble tilsatt var 1/5 av hva man tilsatte en 1 % agarosegel, for å få en DNA konsentrasjon på 5-20 ng. PCR produktet ble fortynnet 1:20 (1 µl PCR produkt og 19 µl sterilt vann). 4 µl fortynnet PCR produkt ble tilsatt 1 µl Loading Dye, blandingen ble applisert på FlashGelen. 3 µl DNA Marker ble tilsatt første og siste brønn, deretter ble FlashGelen kjørt i 5 min på 275 V. Ettersom gelene allerede inneholdt EtBr kunne den fotograferes direkte på GelDoc.

3.6. Størrelsesbestemming av PCR produkt med BioAnalyzer

3.6.1. Prinsipp

Metoden brukes for å påvise og størrelsebestemme PCR produkter. Det negativt ladede DNA molekylet separeres i mikrokkanaler etter ladning-til-masse-forhold i et elektrisk felt. Samtidig med PCR produktene kjøres en størrelsesstand, som PCR produktets størrelse regnes ut ifra. Med internmarkøren justeres PCR produktenes størrelse etter størrelsesstandarden. DNA fragmentene gjøres synlig ved hjelp av fluorescens og detekteres av en laserstråle. Tolv prøver kan analyseres samtidig. BioAnalyzer metoden bestemmer størrelsen på PCR produktet presist, med en feilmargen på 5-10 basepar. Andre fordeler er hastigheten til metoden, liten mengde PCR-produkt og lav deteksjonsgrense (ned til 0,1 ng) (54).

3.6.2. Hensikt

Ut ifra resultatskjemaet (vedlegg 2.) for shigellastammer (tabell 2-2.) og alle primere (tabell 2-1.), ble primersett som har gitt bånd analysert på BioAnalyser for å se på variasjonene i baseparstørrelser til PCR produktetene. Da samme primersett kan gi svært ulike båndstørrelser, særlig mellom de ulike *Shigella* artene, var det nødvendig for hvert primersett å velge minst et bånd per *Shigella* art. Med informasjonen fra BioAnalyseren ble det bestilles nye merkede (fluorescerende) forward primere til analyse på ABI 310. Primerene kan merkes med tre ulike farger (gul, blå og grønn). Det var viktig å velge fargen på primerene slik at man uten tvil skal kunne skille dem etter en multipleks PCR. Primersett som gir PCR produkter med omtrent samme baseparstørrelse kan ikke ha samme farge. Ulik farge på PCR produkter

av omtrent samme baseparstørrelse er nødvendig for å kunne skille disse produktene når de skal separeres samtidig på ABI 310. Med ulike farger på disse primerene vil man enkelt kunne se hvilket primersett som har gitt hvilket PCR produkt av en bestemt størrelse på ABI 310.

3.6.3 Utførelse

Med metoden følger det med Agilent DNA 1000 Kit (5067-1504), som inneholder alt nødvendig:

- DNA chips
- Chip sprøytetajon
- DNA 1000 ladder, størrelsesstandard.
- DNA 1000, merker ved 15 og 1500 basepar og fungerer som internmarkører.
- DNA fluorescerende fargekonsentrat, merker DNA produkt.
- DNA gelmatrix, flytende medium for separasjon av DNA molekyler.

PCR-produktet ble fortynnet 1:20, dvs 1 µl PCR produkt og 19 µl sterilt vann, deretter ble Agilent DNA 1000 Kit Quick Start Guide fulgt.

3.7. DNA mengdebestemmelse med NanoDrop

3.7.1. Prinsipp

NanoDrop er et UV/VIS spektrofotometer, dvs apparatet har kontinuerlig strålingskilde og er utstyrt med en monokromator. Med en monokromator kan bølgelengden varieres (220-750 nm) kontinuerlig, hvilket gjør det mulig fritt å velge bølgelengde ved kvantitative bestemmelse. NanoDropen måler prøver med høy nøyaktighet (2 %) og presisjon (2-4 %) med DNA konsentrasjoner mellom 2 ng/µl - 3700 ng/µl uten fortynning. Instrumentet er bygget opp etter enkeltstråleprinsippet, det betyr at blindprøve og prøve ikke kan måles samtidig. Først måles blindprøven som referansematriale, deretter måles prøvene. 1,5 µl prøve pipetteres på enden av en fiberoptisk kabel. En annen fiberoptisk kabel bringes også i kontakt med den flytende prøven. En xenonlampe er lyskilde og en detektor analyserer mengde lys som passerer prøven ved 260 nm. Detektoren er koblet til en PC, som regner ut DNA prøvemengden etter Beer's lov (55;56).

3.8. Sekvensering

3.8.1. Prinsipp

På midten av 1970 tallet ble to ulike metoder for DNA sekvensering utviklet: Maxim og Gilbert metoden og Sanger dideoxymetoden. Prinsippet for Sanger dideoxymetoden vil bli forklart da det er denne metoden som benyttes her. I Sanger dideoxymetoden bestemmes sekvensen ved å danne mange kopier i ulike lengder av den ene DNA tråden. Enzymet DNA polymerase adderer deoksyribonukleotidtrifosfatene (dNTP) dATP, dTTP, dGTP og dCTP til primeren. I røret er også fluorescensmerkede dideoksyribonukleotidtrifosfater (ddNTP) ddATP, ddTTP, ddGTP og ddCTP med ulike farge slik at de kan blandes i samme rør og gjenkjennes etter farge. Sekvenseringen stopper når polymerasen plukker et fluorescensfarget ddNTP istedenfor et ufarget dNTP. Det vil til slutt være et fluorescensfarget ddNTP i alle posisjonene siden det er så mange DNA fragmenter i alle størrelser. Under elektroforesen separeres DNA fragmentene etter størrelse og det vil være mulig å bestemme rekkefølgen på de fire ddNTP. Alt som skiller DNA fragmentene er et basepar (29;57).

3.8.2. Hensikt

Det er nødvendig å sekvensere noen prøver per primersett for å bevise at det virkelig er VNTR områder som analyseres på ABI 310. Det velges det korteste, det lengste og noen mellomstore DNA fragmenter for alle primerparene. Feilmarginen på ABI 310 er satt til ca. et til to basepar. Noen av VNTR områdene i ulike *Shigella* bakterier skiller med mer enn dette (tre til fire basepar), men antas av like vel å ha samme antall repetisjonsenheter. Disse VNTR områdene analyseres på nytt på ABI 310 og sekvenseres for å bekrefte resultatene.

3.8.3. Utførelse

Det ble utført PCR reaksjoner (tabell 3-2) med programmet annealing 60°C (tabell 3-5) for å få nok templat til sekvensering. PCR produktet ble rensset med QIAquick PCR Purification Kit fra Qiagen (28106) etter produsentens anvisninger. PCR produktet kunne gå tapt under opprensingsprosedyren og for å vite hvor mye templat som var tilstede, måtte templatet analyseres på agarosegel med 5 µl massestandard som referanse eller på NanoDrop. Mengde templat som ble tilsatt en sekvenseringsreaksjon ble bestemt ut ifra hvor rent templatet var og tabell 3-6.

Tabell 3-6. Mengde templat som skal brukes i en sekvenseringsreaksjon:

Templat	Mengde
100-200 bp	1-3 ng
200-500 bp	3-10 ng
500-1000 bp	5-20 ng
1000-2000 bp	10-40 ng
>2000 bp	20-50 ng

Det ble satt opp to sekvensreaksjoner for hvert VNTR område, en med forward primer og en med reverse primer, etter tabell 3-7. Dette ble gjort for å sikre et lesbart sekvenseringsprodukt i tilfelle den ene av to sekvenseringsreaksjoner per primersett ikke var vellykket.

Sekvenseringen ble utført i en "PCR-maskin" etter temperatursyklusen som vist i tabell 3-8.

Tabell 3-7. Oversikt over oppsettet for sekvenseringsreaksjoner for hver enkelt prøve og kontrollprøve.

	µl pr prøve
Ready reaction premix	2
Big Dye Sequencing Buffer	2
Forward eller reverse primer 1 µM	3,2
H ₂ O	11,3
DNA*	1
Sum	20

*Mengde templat varierte.

Tabell 3-8. Oversikt over temperatursyklusene for sekvenseringsreaksjoner.

96°C	1 min	} 25 sykluser
96 °C	10 sek	
50 °C	5 sek	
60 °C	4 min	
4 °C	HOLD	

Sekvenseringsproduktet ble rensset etter Dye-Ex 2.0 Protocol med Dye-Terminator Removal (58). Etter rensing ble sekvenseringsproduktet tørket i åpne eppendorfrør i vakuumsentrifuge i 15 min. Det tørkede produktet ble løst i 12 µl formamid, blandet på vortex mikser og sentrifugert kort, kun for å få ned dråpene på siden. 12 µl prøve ble overført til stativ tilhørende ABI 3130 XL og separasjonen av sekvenseringsproduktet ble satt i gang. Sekvenseringsdataene ble analysert med dataprogramvaren Sequence Scanner fra Applied Biosystems. De analyserte sekvensene ble sammenlignet med sekvenser fra GeneBank, for å finne riktig repetisjonssekvens.

3.9. Kapilærelektroforese - ABI 310 og ABI 3130 XL

3.9.1. Prinsipp

I kapillærgelelektroforese foregår separasjonen av DNA fragmenter i kvartskapillærrør med en gelmatriks av flytende polymer. Begge endene til kapillærrøret holdes fuktig i EDTA-buffer. Ved at separasjonen utføres i et tynt kapillær (50 µm) som gir god varmeavledning, kan høye spenninger legges over kapillæret (59;60). Prøvene plasseres i et brett i instrumentets autosamplere som er i nærheten av katoden. Autosampleren bringer prøvene i kontakt med katoden og den ene enden til kapillæret. En del av prøven injiseres (elektrokinetisk injeksjon) inn i kapillæret når spenning går fra katoden til anoden. Kapillæret plasseres deretter i buffer og strømmen settes på igjen slik at elektroforesen kan begynne. DNA, som er negativt ladet, migrerer mot anoden. Ved anoden er en argon-ion laserstråle som eksiterer de fargede DNA fragmentene og får de til å fluorescere, ulike farger fluorescerer ved ulike bølgelengder. Emittert fluorescens fra fargene samles av et CCD kamera. PCen tolker resultatene dvs. den kalkulerer størrelsen og mengden av DNA fragmentene fra fluorescensintensiteten (57). Kapilærelektroforese er en sensitiv metode, instrumentet kan detektere svært små mengder av et DNA fragment.

3.9.2. Utførelse

3.9.2.1. ABI 310

PCR multipleks (tabell 3-3.) med to bakteriestammer 1104-3332 (*S. sonnei*) og 1104-3238 (*S. flexneri* 1) med begge annealingsprogrammene 55°C og 60°C (tabell 3-5.) og med ulike fortynninger (tabell 3-9.) ble utprøvd. For separasjon på ABI 310 ble det fortynnede PCR produktet blandet med geneflo og formamid som vist i tabell 3-10.

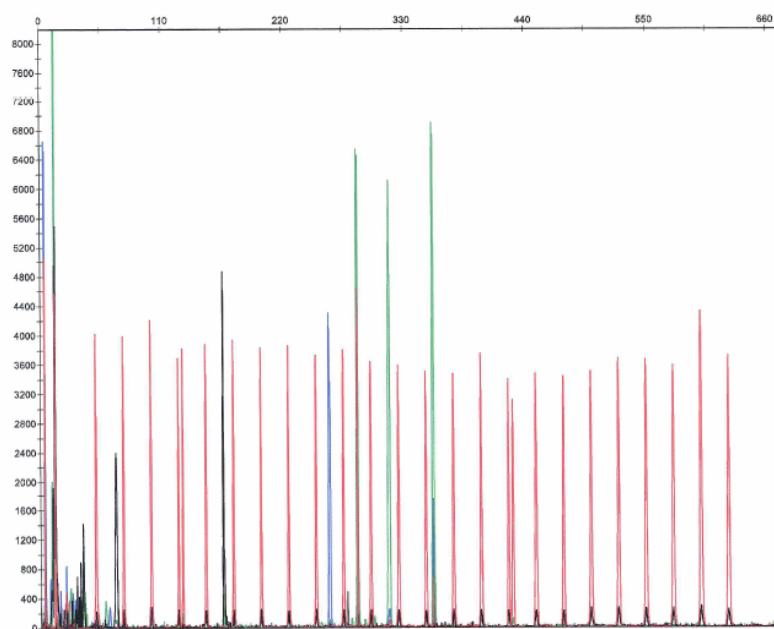
Tabell 3-9. Oversikt over ulike fortynninger som ble forsøkt under utprøvingen av MLVA-*Shigella* metoden på ABI 310.

Fortynningsfaktor	PCR produkt	Sterilt destilert vann
1:1		
1:10 =	1µl	9µl
1:30 =	1µl	29µl
1:100 =	1µl	99µl
1:125 =	1µl	124µl
1:150 =	1µl	149µl

Tabell 3-10. Oversikt over oppsettet for en prøve på ABI 310.

	µl per prøve
Formamid	12
Geneflo	2
Fortynnet PCR produkt	1
Sum	15

Prøvene ble denaturert på PCR apparatet i 3 min på 95 °C, og hatt på is. Etter separasjon på ABI 310 (se figur 3-3.), ble dataprogrammet GeneMapper benyttet til å lese av prøvene. Prøver på over 625 basepar kan ikke bestemmes, da dette er på utsiden av den interne størrelsesmarkøren.



Figur 3-3. Figuren viser 1020-2989 (*S. boydii* serot. 11) i et elektroferogram fra ABI 310. SHTR1 og SHTR4 er egentlig merket med gul farge, men fargen vises som sort i elektroferogrammet. I figuren vises primersettene SHTR4, SHTR2, SHTR3, SHTR8 og SHTR5. Kurvestørrelsene oppgis i baseparstørrelse i dataprogrammet GeneMapper.

3.10. MLVA (Multiple-Locus Variant-repeat Analysis)

3.10.1. Prinsipp

Korte sekvenser av repetisjonsområder, VNTR områder, har vist seg å være godt egnet til å skille bakterier innen samme art. PCR produktlengden vil variere med antallet av VNTR repetisjoner, og dette vil igjen bestemme allelnummeret som er unikt for hver bakteriestamme. Metoden er basert på en multipleks PCR med påfølgende kapillærelektroforese. MLVA-*Shigella* metoden består av en PCR multipleks av seks primersett. MLVA brukes til å samle data til epidemiologiske studier og som hjelpemiddel ved utbrudd.

3.10.2. Utførelse

3.10.2.1. MLVA-*Shigella* metoden

1. Primere ble designet.
2. Bakterieisolater ble funnet frem og DNA ble isolert.
3. Primersett ble undersøkt enkeltvis for om de var i stand til å binde seg på valgte DNA.
4. Ca. baseparstørrelse til PCR produktene ble bestemt på BioAnalyzer.
5. Fluorescensefargede primere ble bestilt for utprøving av multipleks PCR på ABI 310.
6. Riktig fortynning for multipleks PCR på ABI 310 ble prøvd ut.
7. 50 bakterieisolater ble funnet frem og DNA isolert
8. Disse 50 ble utprøvd på MLVA-*Shigella* metoden.
9. Allelnummer ble gitt og MLVA profil beregnet.
10. 21 bakterieisolater ble sekvensert.
11. 133 bakterieisolater ble funnet frem og DNA isolert.
12. Disse 133 ble analysert etter *Shigella* MLVA metoden.
13. 11 bakterieisolater ble sekvensert
14. Nye allelnr ble gitt og nye MLVA profiler beregnet.
15. Stabilitet for MLVA-*Shigella* metoden ble undersøkt
16. 19 randomiserte shigeller ble analysert på nytt for å undersøke reproduserbarheten.
17. Diversitet mellom *Shigella* artene ble målt og dendrogram og MST laget.

3.10.2.2. MLVA–*E.coli* metoden

MLVA–*E.coli* metoden ble utført på 10 bakterier som MLVA–*Shigella* metoden også ble utført på. MLVA–*E.coli* metoden ble utført etter protokoll ved FHI (49).

3.11. MLVA–*Shigella* metodens reproduserbarhet og stabilitet

3.11.1. Utførelse av reproduserbarhetsstudie

For å undersøke reproduserbarheten til metoden ble 10 % av alle typede *Shigella* analysert på nytt etter MLVA–*Shigella* metoden. Nitten randomiserte *Shigella* stammer ble sådd ut fra stikkagar til laktoseskål på nytt. Deretter ble MLVA–*Shigella* analyser utført på DNA isolert fra disse nye skålene.

3.11.2. Utførelse av stabilitetsstudie

For å se på stabiliteten til MLVA metoden ble fire bakterieisolater 1105-2845 (*S. sonnei*), 1106-2674 (*S. boydii* 8), 1105-0889 (*S. dysenteriae* 2), 1105-3264 (*S. flexner*) en fra hver *Shigella* art, om sådd på laktoseskåler fra 19.06.07 til 02.10.07. Bakteriene ble sådd ut fra stikkagar til laktoseskåler og inkubert ved 35 °C i et døgn. En øse bakteriekolonier ble overført til nye laktoseskåler og inkubert, dagen etter ble denne ferske laktoseskålen brukt til nye overføringer og slik fortsatte det mandag til fredag. På fredager ble bakterieskålene satt i inkubatorskap som holdt 4°C frem til søndag. På søndagene økte temperaturen til 35°C, slik at det ble bakterievekst på laktoseskålene til mandag. Med 5 omsåinger i 15 uker blir det ca. 75 omsåinger totalt. Bakterieisolatene ble analysert etter MLVA–*Shigella* metoden en gang etter første omsåing, en gang ca. midt under omsåingene og en gang helt til slutt.

4. Resultater

4.1. Utprøving av *Shigella* primere

Det ble utført PCR reaksjoner for hvert primersett med 20 bakteriestammer (fem fra hver *Shigella* art) etter tabell 3-2. Prøvene ble satt opp som vist i figur 3-1. Temperatursyklusene var som vist i tabell 3-5 og annealingstemperatur var 60°C. Etter utført PCR ble PCR produktene analysert på agarosegel. Oppsettet på agarosegel var som vist i figur 3-2. Resultatene etter utprøving av de åtte primersettene med 20 bakteriestammer, er vist i vedlegg 2. Primersett SHTR6 var det eneste primersettet som ikke ga PCR produkt med noe bakterie DNA, SHTR6 ble derfor utelatt fra videre utprøving av MLVA metoden.

4.2. Størrelsesbestemming av PCR produkter på BioAnalyzer og fargevalg av primere

For å blande syv primersett til en PCR multipleks er det nødvendig å vite ca. hvor store PCR produkt de ulike primersettene er. Det er nødvendig for å få optimal merking med fluorescerende farger på forward primerene, slik at man alltid vet hvilke primere som har gitt hvilke PCR produkter (se avsnitt 3.6.2.). De samme PCR produktene som ble benyttet i 4.1, ble brukt videre til størrelsesbestemming av PCR produktene på BioAnalyzer.

Tabell 4-1. Tabellen viser en oversikt over baseparstørrelsene til PCR produktene, analysert på BioAnalyzer. Den første kolonnen viser hvilke bakteriestammer de ulike primerene ble prøvd ut på. Den grå raden oppgir primersettene som ble undersøkt.

Forventet bp.størrelse*	289 - 387	349 - 356	285 - 344	128 - 234	341 - 348	396 - 483	301 - 313
SHTR1 (<i>S.soneri</i>)	SHTR2 (<i>S.sonnei</i>)	SHTR3 (<i>S.boydii</i>)	SHTR4 (<i>S.boydii</i>)	SHTR5 (<i>S.dysenteriae</i>)	SHTR7 (<i>S.flexneri</i>)	SHTR8 (<i>S.flexneri</i>)	
<i>S.boydii</i> 13 (1104-1869)	329 bp	293 bp	129 bp	351 bp			316 bp
<i>S.dysenteriae</i> (1020-6332)	262 bp	294 bp	168 bp	351 bp			310 bp
<i>S. flexneri</i> (1104-3238)	385 bp	292 bp	168 bp	349 bp	482 bp		319 bp
<i>S. sonnei</i> (1104-3332)	326 bp	331 bp	292 bp	161 bp	344 bp		310 bp

* øverste rad gir en indikasjon på ca. baseparstørrelse for allelene, tall fra GeneBank.

Utifra resultatene fra BioAnalyzer (tabell 4-1.) kan man se at det er fem primersett (SHTR1, SHTR2, SHTR3, SHTR5 og SHTR8) som alle gir PCR produkter på ca 300 basepar. Det var viktig å skille disse fem primerparene på beste måte med de tre ulike fargene som er tilgjengelig. Det virket som om primerparene SHTR3, SHTR5 og SHTR8 ga lite polymorfe PCR produkter for de ulike bakteriestammene som ble analysert, alle fikk derfor grønn farge. Primersett SHTR2 ga PCR produkter i varierende baseparstørrelse rundt 300 og fikk fargen blå. Primersett SHTR7 har gitt et bånd på BioAnalyzer som er ca 100 basepar større en det største produktet til primersett SHTR2, SHTR2 fikk derfor også blå farge. Primersett SHTR1 ga et bånd rundt 300 basepar og fikk fargen gul. Primersett SHTR4 med kun lave båndstørrelser kunne også få fargen gul, uten at det skulle føre til misforståelser. Tabell 4-2. oppsummerer fargetildelingen for de ulike primerparene.

Tabell 4-2. Oversikt over fargevalg av primere til MLVA etter bearbeidelse av data fra BioAnalyzer. Primersettene SHTR1 og SHTR4 vises som grå/sorte på ABI 310, selv om de egentlig er merket med gul farge. SHTR6 er ikke med i videre utprøving av MLVA–*Shigella* metoden, den er derfor ikke merket med en farge.

Primer	Farge
SHTR1	HEX
SHTR2	6FAM
SHTR3	TET
SHTR4	HEX
SHTR5	TET
SHTR6	
SHTR7	6FAM
SHTR8	TET

4.3. MLVA-*Shigella* metoden

Etter at merkingen av fluorescerende fargede primere var bestemt, ble de syv ulike primersettene blandet i en reaksjon til en PCR multipleks. Disse PCR reaksjonene ble blandet som vist i tabell 3-3 og utført etter temperatursyklus som vist i tabell 3-5. Denne PCR multipleksen ble utprøvd på to ulike shigellaisolater (avsnitt 3.9.2.1.). Etter PCR ble ulike PCR fortynninger (tabell 3-9) prøvd ut på ABI 310. Alle PCR fortynningene ble først blandet med genflo og formamid for separasjon på ABI 310 (tabell 3-10). PCR reaksjonen hvor annealingstemperaturen 60°C ble benyttet, ga klarere PCR produkter på ABI 310 enn annealingstemperaturen 55°C. Fortynningen 1:150, viste seg å være den beste for tydeligst

separasjon av PCR produktene på ABI 310. Isolering av DNA til MLVA–*Shigella* metoden ble gjort på to ulike måter som beskrevet i avsnitt 3.3.1. og 3.3.2. De ulike isoleringsmetodene ga like gode resultater.

En PCR multipleks bestående av de syv ulike primersettene ble blandet som vist i tabell 3-3, for utprøving på 50 bakterieisolater. For PCR ble den beste annealingstemperaturen på 60°C benyttet, deretter ble PCR produktet fortynnet 1:150 for separasjon på ABI 310. Etter analyse av de 50 bakteriestammene på ABI 310 ble primersett SHTR5 tatt ut fra MLVA–*Shigella* metoden underveis i utprøvingen, da primersettet ga svært lite polymorfe PCR produkter. Primersettet ga kun et produkt på 357 basepar, ellers ga det ikke produkt i det hele tatt. De resterende 133 bakterieisolatene ble utprøvd med MLVA–*Shigella* metoden bestående av seks ulike primersett (tabell 3-4). Reproduserbarhet og stabilitetsundersøkelsene ble også utført med den nyeste versjonen av MLVA–*Shigella* metoden.

Alle PCR resultatene etter typing på MLVA–*Shigella* metoden ble oppgitt i baseparstørrelse i elektroferogrammet fra ABI 310. MLVA profil ble tildelt bakterieisolatene senere, etter allelnummer tildeling (tabell 4-4.). VNTR områder som skilte med tre til fire basepar ble analysert på nytt, for å bekrefte at det var samme allel. Noen ble analysert som PCR multipleks (tabell 3-4.) og andre enkeltvis med kun en primer (tabell 3-2.). De uklare VNTR områdene ble også sekvensert for å bekrefte resultatet. Under tolkingen av noen av elektroferogrammene var det noen ulike primersett med samme farge som ga uklare resultater. Disse primersettene ble analysert alene med bakterieisolatene det gjaldt på ABI 310. På MLVA–*Shigella* metoden ble totalt 183 ulike bakterier typet:

11 *E. coli*, 43 *S. boydii*, 40 *S. dysenteriae*, 46 *S. flexneri* og 43 *S. sonnei*. MLVA profiler og baseparstørrelse for hvert allel er oppgitt i vedlegg 3.

E. coli bakterier ble også typet med MLVA–*Shigella* metoden. Det var for å undersøke om metoden i det hele tatt var appliserbar på *E. coli*. Etter bekreftelsen på at metoden fungerte på *E. coli* var det ønskelig å se om MLVA–*Shigella* skilte godt mellom *E. coli*. Årsaken til at *E. coli* isolatene i tabell 4-3 ble typet på MLVA–*Shigella* metoden var for å undersøke om disse isolatene egentlig var likere *Shigella* enn *E. coli*, ettersom det ikke var mulig å skille disse *E. coli* godt på MLVA–*E. coli* metoden. Begge MLVA metodene ga kun utslag på et locus for de to *E. coli* vist i tabell 4-3 (uthevet i tabellen).

Tabell 4-3. Oversikt over to *E. coli* som ble typet med begge MLVA metodene. Tabellen viser MLVA profilene til bakteriene etter de to ulike metodene

Stamme nr	Bakterie	MLVA- <i>Shigella</i> metode	MLVA- <i>E. coli</i> metode
1020-6607	<i>E. coli</i> O:128	00-00-00-00-00-04	00-00-00-00-00-00-01
1030-6430	<i>E. coli</i> O:128	00-00-00-00-00-04	00-00-00-00-00-00-01

4.4. MLVA-*E. coli* metoden

MLVA-*E. coli* metoden ble utført på 10 *E. coli* som MLVA-*Shigella* metoden også ble utført på. Utvalget av bakterier som har blitt typer med begge metodene er for lite til å kunne trekke konkrete slutninger om sammenligningen.

4.5. Tildeling av allele nummer for MLVA-*Shigella* metoden.

Før alle typede bakterier kan få hvert sitt MLVA profilnummer, må det tildeles et allelnummer til hver unike PCR baseparstørrelse. Alle analyseresultatene fra MLVA-*Shigella* metoden, oppgitt i baseparstørrelser, ble separert i seks bolker etter hvert primersett (se vedlegg 3). Dette var nødvendig fordi analysene var gjort som PCR multipleks og ikke hvert primersett enkeltvis. Deretter ble allelnummer tildelt ved å sette opp alle baseparstørrelsene for et locus i økende rekkefølge som vist i tabell 4-4. Perfekt økning i baseparstørrelse skulle samsvare med størrelsen på repetisjonsenheten. For eksempel skulle SHTR4 produktene øke med seks basepar fra minste allel på 124 basepar. Dette er ikke tilfelle på grunn av feilmarginer i PCR produktet og kapillærelektroforeseapparatet, og må derfor tas med i betraktning når allelnummer skal tildeles. De fleste allelnummerene har av samme årsak et intervall av en til tre basepar. For eksempel primersett SHTR3 sine PCR produkter kunne variere mellom 286, 287 og 288, men alle har allelnummer 2, fordi de mest sannsynlig består av samme antall repetisjonsenheter. Ved usikkerhet om det var funnet en ny allel eller om det kun var snakk om feilmarginer, ble PCR produktene reanalysert på ABI 310 og/eller sekvensert. Nye unike PCR størrelser som blir funnet med MLVA-*Shigella* metoden i fremtiden, vil få tildelt allelnummer uavhengig av sin baseparstørrelse. Et eksempel: Dersom det oppdages et PCR produkt på 360 basepar for SHTR2 vil det få allelnummer 20 eller høyere.

Tabell 4-4. Tabell over tildelingen av allelnummer, etter resultatene fra MLVA typing. De ulike fargene illustrerer hvilke farger primersettene ble merket med for separasjon på ABI 310.

*	6 bp.	7 bp.	6 bp.	6 bp.	9 bp.	7 bp.
Allelnr (under):	SHTR1 (<i>S.sonnei</i>)	SHTR2 (<i>S.sonnei</i>)	SHTR3 (<i>S.boydii</i>)	SHTR4 (<i>S.boydii</i>)	SHTR7 (<i>S.flexneri</i>)	SHTR8 (<i>S.flexneri</i>)
1	**	262-263 bp.	282 bp.	124 bp.	384-385 bp.	295 bp.
2	**	283 bp.	286-288 bp.	129-130 bp.	393 bp.	300 bp.
3	**	290 bp.	294 bp.	135 bp.	402 bp.	309-310 bp.
4	302-303 bp.	304 bp.	300 bp.	141 bp.	411-412 bp.	316-318 bp.
5	321 bp.	311 bp.	306 bp.	147-148 bp.	421 bp.	324-326 bp.
6	325-327 bp.	318 bp.	312-313 bp.	153-154 bp.	429-430 bp.	
7	333 bp.	325-327 bp.	319 bp.	159-161 bp.	438-439 bp.	
8	339-340 bp.	330-332 bp.	325 bp.	166-168 bp.	448 bp.	
9	345 bp.	339-340 bp.	330-331 bp.	172 bp.	466-467 bp.	
10	350-351 bp.	346-347 bp.	338 bp.	177-178 bp.	475-477 bp.	
11	357 bp.	353 bp.	344 bp.	183-184 bp.	484 bp.	
12	364 bp.	367 bp.	356 bp.	189 bp.	494 bp.	
13	369 bp.	373-374 bp.		195-196 bp.	503 bp.	
14	375 bp.	381 bp.		201-203 bp.	512 bp.	
15	381 bp.	388 bp.		207 bp.	521-522 bp.	
16		394 bp.		213 bp.	540 bp.	
17		402 bp.		231-232 bp.	548 bp.	
18		408-409 bp.		250 bp.	576 bp.	
19		416-417 bp.		268 bp.		

* Øverste rad oppgir antall basepar en repetisjonsenhet består av for de ulike VNTR loci.

** Allelnummereringen for SHTR1 begynner på nummer 4.

Det ble funnet PCR produkter på under 302 basepar som ble forsøkt sekvensert, men forsøket mislykket. Ettersom det ikke var mulig å bekrefte om PCR produktene på under 302 basepar faktisk var VNTR området, ble det valgt å se bort ifra disse allelene. Det største PCR produktet (678 basepar) til primersett SHTR1 med *S. boydii* (stammenummer 1106-4065) ble sekvensert, og her ble det funnet et IS-element (se diskusjon for nærmere forklaring). På grunn av de to overnevnte årsakene ble det valgt å se bort ifra PCR produktene til primersett SHTR1 i andre *Shigella* arter enn i *S.sonnei*.

Tabell 4-5. Oppsummering av sekvenseringsresultatene. Siste kolonne oppgir antall repetisjonsenheter funnet ved sekvensering. Nest siste kolonne angir baseparstørrelsen på PCR produktet funnet med MLVA–*Shigella* metoden. De ulike fargene illustrerer fargene primerene har under MLVA–*Shigella* metoden og viser ulike VNTR locus.

Primer	Stamme nr	Bakterie	MLVA-profil	Ant. bp	Ant. rep
SHTR1- <i>S.sonnei</i>	1020-9606	<i>S. sonnei</i>	04-04-02-10-00-04	302	1
SHTR1- <i>S.sonnei</i>	1104-0302	<i>S. sonnei</i>	09-07-02-07-00-04	345	8
SHTR1- <i>S.sonnei</i>	1104-3271	<i>S. sonnei</i>	11-07-02-06-00-04	357	10
SHTR1- <i>S.sonnei</i>	1105-2845	<i>S. sonnei</i>	13-05-02-06-00-04	369	12
SHTR1- <i>S.sonnei</i>	1107-0535	<i>S. sonnei</i>	15-09-02-07-00-04	381	14
SHTR1- <i>S.sonnei</i>	1106-4065	<i>S. boydii</i>	01-00-04-09-00-04	678*	1
SHTR2- <i>S.sonnei</i>	1105-1410	<i>S. dysenteriae</i> serot. 8	00-01-02-10-00-04	262	2
SHTR2- <i>S.sonnei</i>	1104-0302	<i>S. sonnei</i>	09-07-02-07-00-04	326	11
SHTR2- <i>S.sonnei</i>	1106-1540	<i>S. sonnei</i>	06-08-02-06-00-04	330	12
SHTR2- <i>S.sonnei</i>	1106-3306	<i>S. sonnei</i>	00-00-11-14-00-04	339	13
SHTR2- <i>S.sonnei</i>	1030-2614	<i>S. sonnei</i>	05-19-02-06-00-04	416	24
SHTR3- <i>S.boydii</i>	1030-2614	<i>S. sonnei</i>	05-19-02-06-00-04	288	2
SHTR3- <i>S.boydii</i>	1030-2175	<i>S. boydii</i> serot. 14	00-00-04-06-00-04	300	4
SHTR3- <i>S.boydii</i>	1106-0772	<i>S. boydii</i> serot. 4	00-00-11-09-00-04	344	7**
SHTR3- <i>S.boydii</i>	1106-3202	<i>S. boydii</i> serot. 4	00-00-12-15-00-04	356	13
SHTR4- <i>S.boydii</i>	1105-1148	<i>S. boydii</i> serot. 13	00-02-02-01-00-04	124	1
SHTR4- <i>S.boydii</i>	1020-4990	<i>S. dysenteriae</i> serot.1	00-00-02-02-00-00	129	2
SHTR4- <i>S.boydii</i>	1104-3271	<i>S. sonnei</i>	11-07-02-06-00-04	154	3
SHTR4- <i>S.boydii</i>	ECOR34	<i>E. coli</i> O:88	00-01-02-08-00-04	168	8
SHTR4- <i>S.boydii</i>	1104-0145	<i>S. flexneri</i> serot. X	00-00-02-08-15-05	166	8
SHTR4- <i>S.boydii</i>	1106-2674	<i>S. boydii</i> serot. 8	00-00-02-16-00-00	213	12
SHTR4- <i>S.boydii</i>	1107-1020	<i>S. boydii</i> serot. 8	00-00-02-19-00-00	268	20
SHTR7- <i>S.flexneri</i>	1103-0481	<i>S. flexneri</i>	00-00-02-07-01-04	384	1
SHTR7- <i>S.flexneri</i>	1105-3264	<i>S. flexneri</i> serot. y	00-00-02-05-12-05	494	13
SHTR7- <i>S.flexneri</i>	1105-0523	<i>S. flexneri</i> serot. 2	00-00-02-03-15-05	522	16
SHTR7- <i>S.flexneri</i>	1107-1122	<i>S. flexneri</i> serot. 1	00-00-02-09-18-05	576	22
SHTR8- <i>S.flexneri</i>	1030-6430	<i>E. coli</i> O:128	00-00-00-00-00-04	319	1
SHTR8- <i>S.flexneri</i>	1106-0939	<i>S. boydii</i> serot. 9	00-11-02-02-00-01	295	1
SHTR8- <i>S.flexneri</i>	1106-1079	<i>S. sonnei</i>	06-16-02-08-00-04	316	4
SHTR8- <i>S.flexneri</i>	1105-1268	<i>S. dysenteriae</i> serot. 3	00-00-02-06-00-04	318	4
SHTR8- <i>S.flexneri</i>	1105-0523	<i>S. flexneri</i> serot. 2	00-00-02-03-16-05	325	5
SHTR8- <i>S.flexneri</i>	1104-0238	<i>S. flexneri</i>	00-00-02-09-10-05	325	5

*Det store produktet kommer av IS-element i stammen *S. boydii*, stammenr. 1106-4065.

**Dette sekvenseringsresultatet er mest sannsynlig ikke helt riktig. Sekvensen er ikke lesbar etter syv repetisjonsenheter da VNTR områder kan være vanskelig å sekvensere, men trolig er det flere repetisjonsenheter tilstede.

4.7. Reproduserbarhet

Reproduserbarhetsstudien ble utført som beskrevet i avsnitt 3.11.1. Nitten shigeller, ca. 10 % av alle typede shigeller, ble analysert etter MLVA–*Shigella* metoden for å undersøke reproduserbarheten. Utifra MLVA profilene i tabell 4-4, kan man se at MLVA profilene etter andre typing er identiske med første typing.

Tabell 4-6. Tabellen viser MLVA profil etter første gangs analyse, og MLVA profil etter ny analyse (se vedlegg 4.).

Stamme nr	Bakterie	MLVA profil etter første typing	MLVA profil etter andre typing
1104-0092	<i>S. sonnei</i>	09-18-02-14-00-04	09-18-02-14-00-04
1105-2791	<i>S. flexneri</i> serot.2	00-00-02-08-04-05	00-00-02-08-04-05
1105-1410	<i>S. dysenteriae</i> serot.8	00-01-02-10-00-04	00-01-02-10-00-04
1105-2508	<i>S. dysenteriae</i> serot.3	00-00-02-05-00-04	00-00-02-05-00-04
1106-3086	<i>S. sonnei</i>	09-17-02-05-00-04	09-17-02-05-00-04
2126/85	<i>S. dysenteriae</i> serot.1	00-00-02-02-00-00	00-00-02-02-00-00
1107-0339	<i>S. sonnei</i>	11-18-02-07-00-04	11-18-02-07-00-04
1105-3300	<i>S. flexneri</i> serot.2	00-00-02-04-16-05	00-00-02-04-16-05
E2641/97	<i>S. dysenteriae</i> serot.4	00-00-02-13-00-04	00-00-02-13-00-04
1107-1081	<i>S. flexneri</i> serot.5	00-00-02-05-01-04	00-00-02-05-01-04
1010-6540	<i>S. boydii/E.coli</i>	00-17-02-01-00-04	00-17-02-01-00-04
1107-0790	<i>S. flexneri</i> serot.2	00-00-02-09-06-05	00-00-02-09-06-05
1105-0889	<i>S. dysenteriae</i> serot.2	00-01-02-05-00-03	00-01-02-05-00-03
1106-2070	<i>S. sonnei</i>	08-07-02-07-00-04	08-07-02-07-00-04
1107-0160	<i>S. dysenteriae</i> serot.2	00-01-02-03-00-03	00-01-02-03-00-03
1106-1539	<i>S. flexneri</i>	00-00-02-06-05-05	00-00-02-06-05-05
1107-1020	<i>S. boydii</i> serot. 8	00-00-02-19-00-00	00-00-02-19-00-00
1104-0145	<i>S. flexneri</i> serot. x	00-00-02-08-14-05	00-00-02-08-14-05
1030-6141	<i>S. dysenteriae</i> serot.2	00-01-02-07-00-03	00-01-02-07-00-03

4.8. Stabilitetsstudie

Stabilitetsstudien ble utført som beskrevet i 3.11.2. Stabilitetsstudien viser at MLVA-*Shigella* metoden er stabil, ettersom MLVA profilene er identiske (tabell 4-7).

Tabell 4-7. Oversikt over MLVA stabilitetsresultater. Tabellen viser MLVA profiler ved tre ulike tidspunkt (se vedlegg 5).

Stammenr	Bakterie	MLVA profil*	MLVA profil**	MLVA profil***
1105-3264	<i>S. flexneri serot.y</i>	00-00-02-05-12-05	00-00-02-05-12-05	00-00-02-05-12-05
1106-2674	<i>S. boydii serot. 8</i>	00-00-02-16-00-00	00-00-02-16-00-00	00-00-02-16-00-00
1105-2845	<i>S. sonnei</i>	13-05-02-06-00-04	13-05-02-06-00-04	13-05-02-06-00-04
1105-0889	<i>S. dysenteriae serot.2</i>	00-01-02-05-00-03	00-01-02-05-00-03	00-01-02-05-00-03

* Resultatene fra MLVA typing før omsåingen begynte, dvs før 19.06.07.

** Resultatene fra MLVA typing underveis i omsåingen, 10.09.07

*** Resultatene fra MLVA typing etter siste omsåing, 02.10.07

4.9. Locusdiversitet

Locusdiversitet måles ved hjelp av "Simpson's index of diversity", etter formelen:

$$1 - \sum (n/N)^2$$

n = antallet av et allel

N = totalt antall alleler

Diversitet måles i et tall mellom 0 og 1, jo større tall desto bedre diversitet.

Ut ifra diversitetsdataene i tabell 4-8 kan man se at primersett SHTR1 skiller *S. sonnei* veldig godt med en diversitet på 0,89. SHTR1 kan gi falske produkter i andre arter enn *S. sonnei*, SHTR1 produkter i andre arter ble derfor sett bort ifra under MLVA typing. Primersett SHTR2 skiller svært godt blant *S. sonnei* med en diversitet på 0,94. SHTR2 skiller også de andre artene, men ikke fullt så godt. Primersett SHTR3 skiller *S. boydii* best med en diversitet på 0,79. SHTR3 skiller de andre artene også, men ikke særlig godt. Primersett SHTR4 er det mest polymorfe primersettet, som skiller alle artene svært godt med en sammenlagt diversitet på 0,91. SHTR4 skiller sin egen art best med en diversitet for *S. boydii* på 0,93. SHTR4 skiller de tre andre artene på diversitet mellom 0,8 og 0,9. Primersett SHTR7 er kun spesifikk for sin egen art *S. flexneri*. SHTR7 gir de mest polymorfe PCR produktene med den beste diversiteten av alle loci,

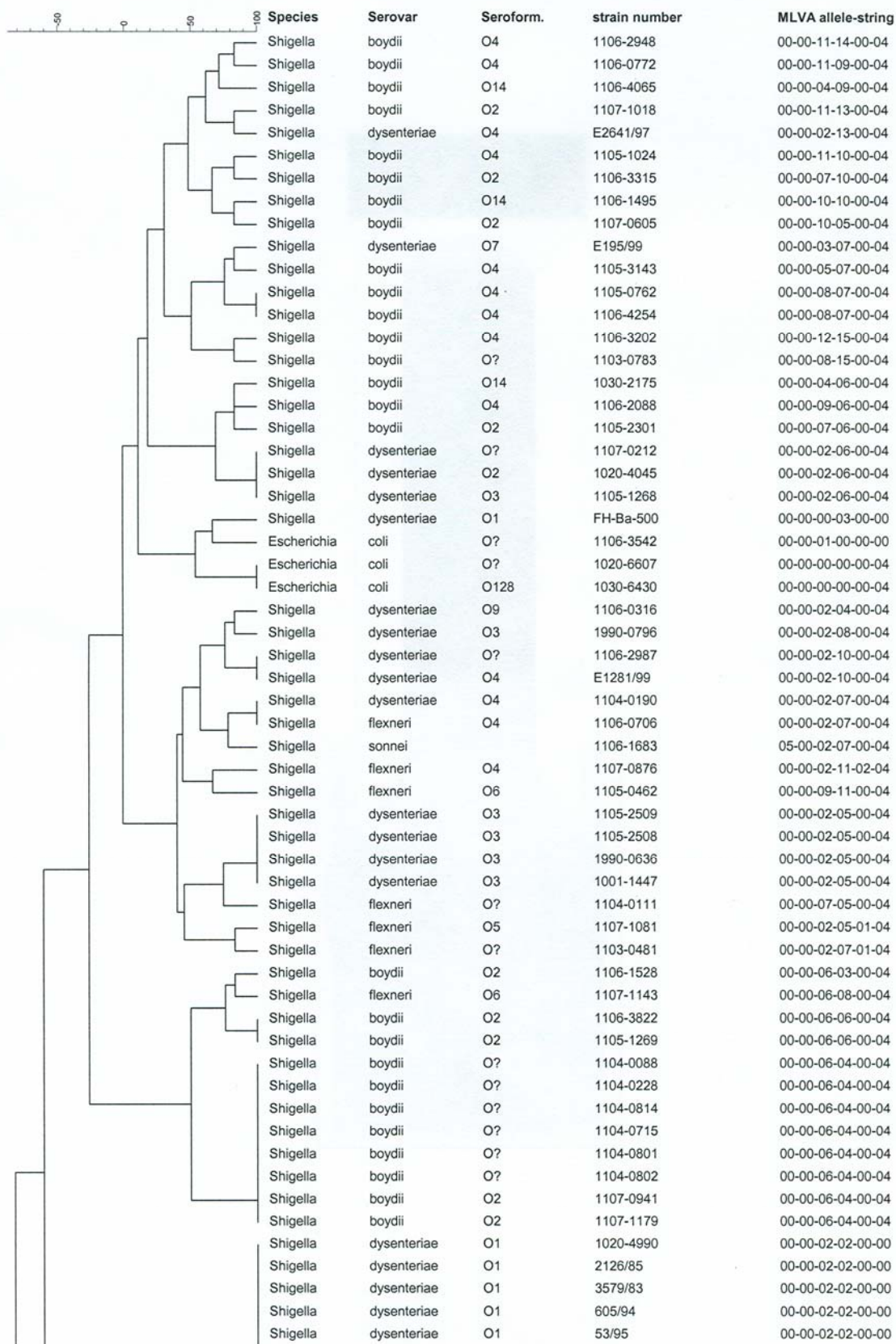
på 0,95. Primersett SHTR8 skiller middels godt for hver art og er de eneste primerene som skiller best for en annen art enn sin egen. SHTR8 skiller med 0,45 for *S. flexneri* som er arten primersettet stammer fra, og skiller med en diversitet på 0,66 for *S. dysenteriae*.

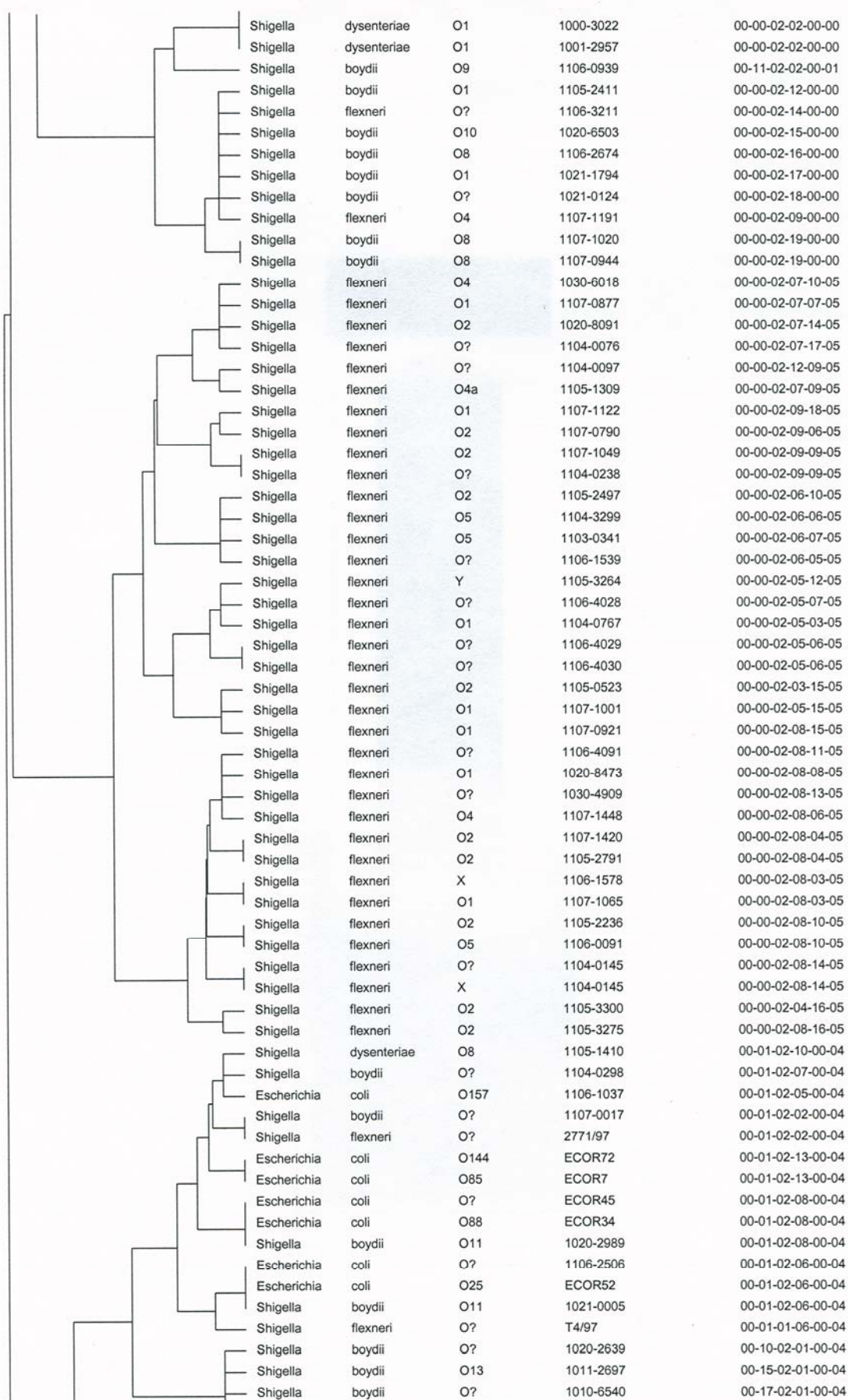
Tabell 4-8. Oversikt over locusdiversitet for hver *Shigella* art og locusdiversitet for alle artene.

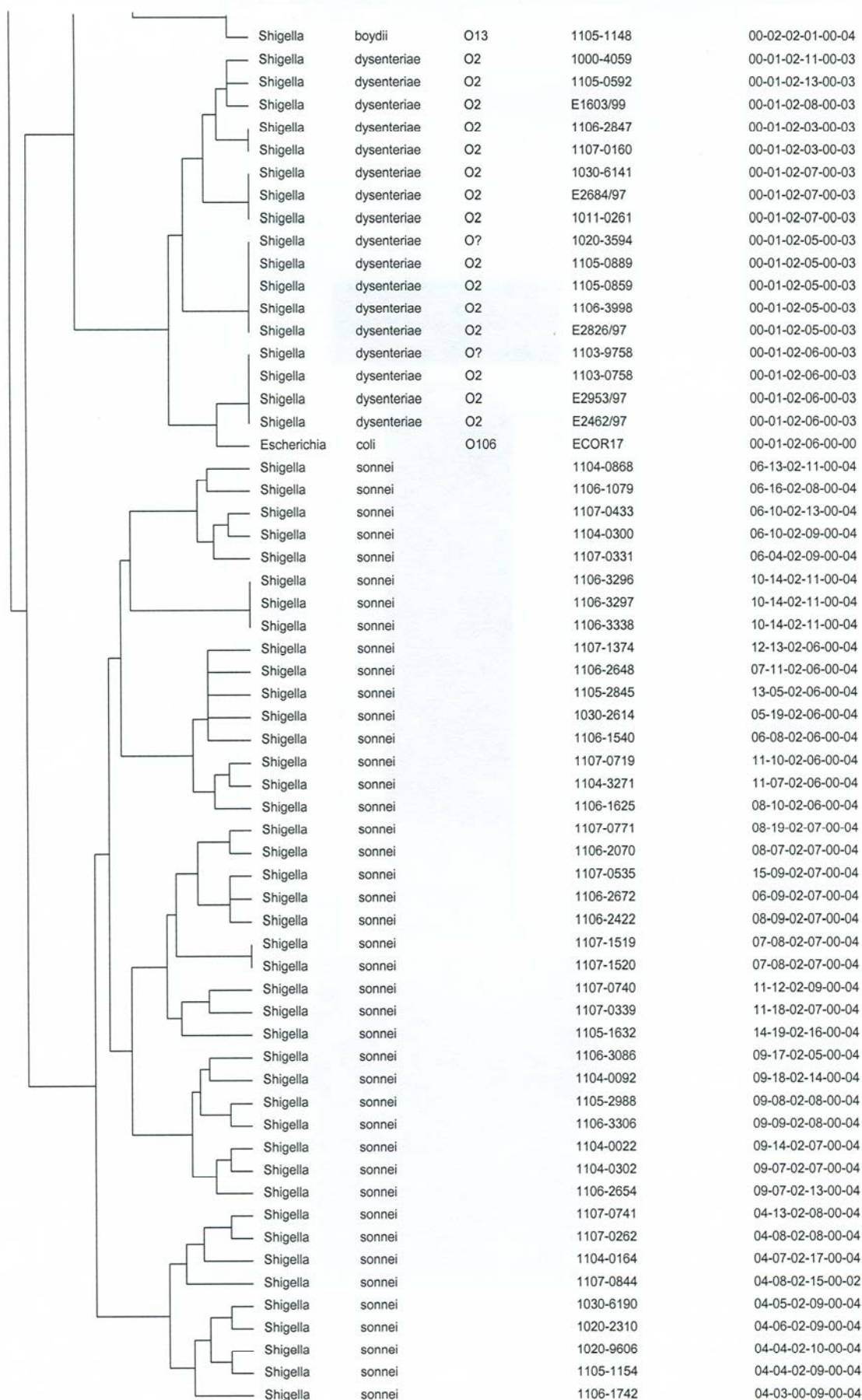
	SHTR1 (<i>S. sonnei</i>)	SHTR2 (<i>S. sonnei</i>)	SHTR3 (<i>S. boydii</i>)	SHTR4 (<i>S. boydii</i>)	SHTR7 (<i>S. flexneri</i>)	SHTR8 (<i>S. flexneri</i>)
<i>S. boydii</i>	0,0	0,37	0,79	0,93	0,0	0,32
<i>S. dysenteriae</i>	0,0	0,51	0,10	0,88	0,0	0,66
<i>S. flexneri</i>	0,0	0,08	0,17	0,83	0,95	0,45
<i>S. sonnei</i>	0,89	0,94	0,05	0,87	0,0	0,05
Alle arter	0,41	0,62	0,37	0,91	0,40	0,59

4.10. Dendrogram

Dendrogram er et diagram utformet som et tre og illustrerer hvordan de ulike bakterieisolatene er klassifisert i ulike grener - klustere. Dendrogrammet gir et bilde på hvordan de ulike bakterieisolatene er genetisk beslektet ut ifra VNTR områdene, som ikke må forveksles med evolusjonært slektskap. Dendrogrammet viser flere forgreninger ved mer variasjon i bakterieisolatene. Flere klustere av bakterieisolater er kun mulig dersom MLVA-*Shigella* metoden separerer ulike bakterieisolater godt. Dendrogram, danner ”biblioteket” nevnt i avsnitt 1.4.2., og er nyttig for å plassere og sammenligne utbruddsprofiler med de allerede eksisterende bakterieprofilene for bakterien.

Dendrogram (Ward): *Shigella* spp. MLVA metoden





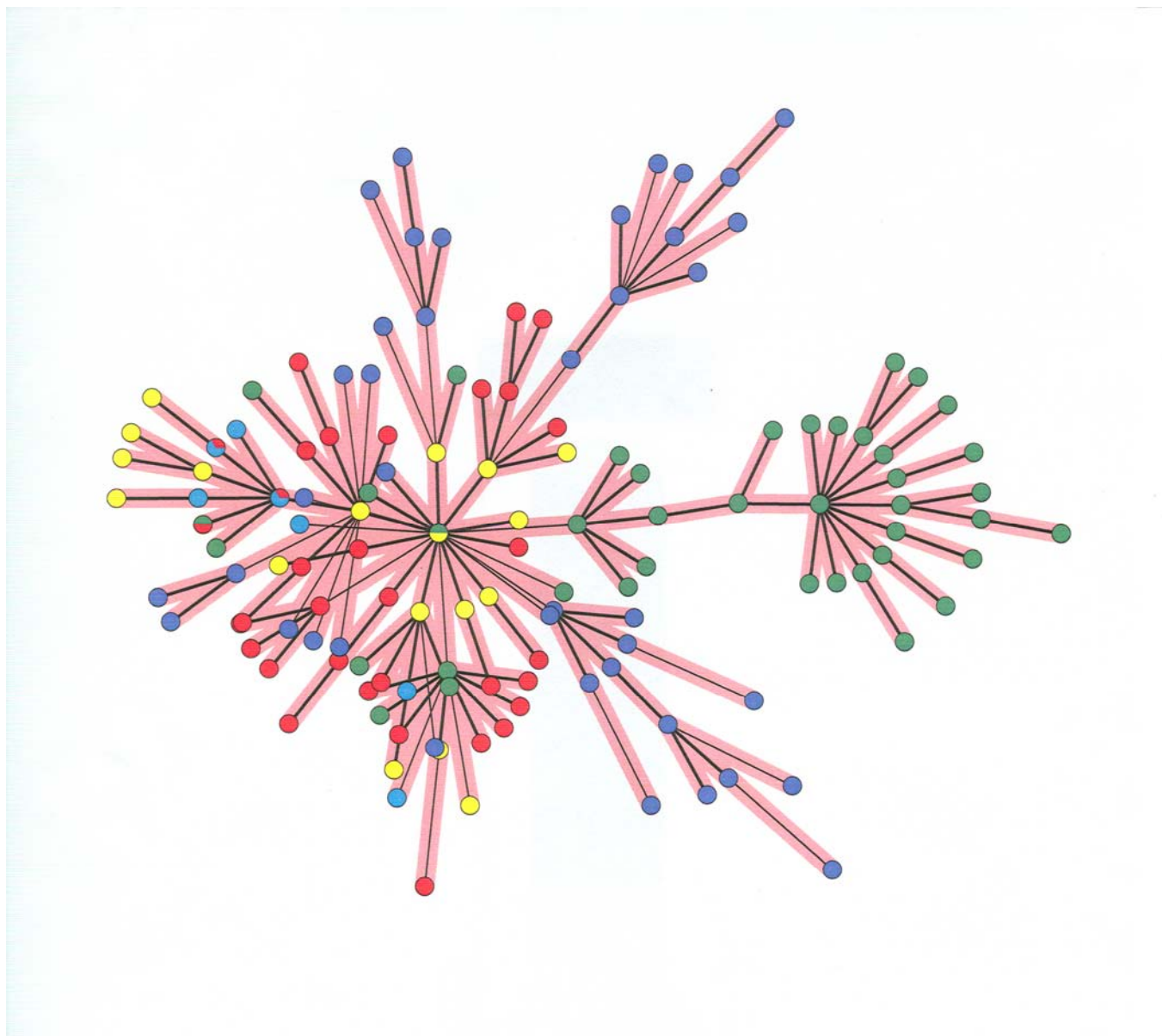
Figur 4-2. Figuren viser et dendrogram over *Shigella* sp. og *E. coli* etter alle 183 MLVA profiler fra *Shigella* metoden. Dendrogrammet er utarbeidet med "categorical coefficients" og Ward algoritmen med dataprogrammet BioNumerics fra Applied Maths. Ved å benytte categorical coefficients blir allelnumrene oppfattet som uordnede, og det vil si at den samme statistiske vekten blir gitt uansett om det er store eller små forandringer i repetisjonsantallet innen hvert lokus.

Fra dendrogrammet (figur 4-2) kan man se at *S. sonnei* har gruppert seg helt ut fra de andre isolatene, utenom en enkelt *S. sonnei* (1106-1683). MLVA metoden viser også særlig god diversitet for *S. sonnei*, det er svært få *S. sonnei* som har identisk profil. *S. flexneri* grupperer seg særlig i en egen gren, og noe sporadisk rundt om i treet. *S. flexneri* er også godt differensiert. De andre *Shigella* artene har ikke gruppert seg like godt. Metoden differensierer ikke *S. dysenteriae* særlig godt i dendrogrammet. Det viser seg at *S. boydii* også har en del identiske profiler. To *E. coli* klustrer seg med en *S. boydii* i dendrogrammet hvor alle tre har identisk profil. Dette skjer to ganger.

4.11. Minimum Spanning Tree - MST

Hver sirkel i MST representerer en eller flere alleler av en særegen genotype. MST gir et bilde av hvordan genotypene er forbundet til hverandre på den enkleste mulige måten. Hver ulik sirkel og gren er forbundet med de allelene som er minst ulik sin egen genotype (50). MST benyttes til å se på genetisk slektskap ut ifra VNTR områdene og må ikke forveksles med evolusjonært slektskap. Under eventuelle utbrudd er det nyttig å kunne plassere utbruddsprofilen på MST og se etter mulig genetisk slektskap.

Fra MST (figur 4-3.) kan man se at *S. flexneri* samler seg særlig i en egen gren, og noe sporadisk rundt om i treet. De andre shigellaartene er ikke separert like godt. *E. coli* er ikke samlet i en gren, men spredt blant de andre shigellaartene



Figur 4-3. Minimum spanning tree (MST) for *Shigella* sp og *E. coli*. etter alle 183 MLVA profiler fra *Shigella* metoden. MST er utarbeidet med dataprogrammet BioNumerics fra Applied Maths.: Røde sirkler = *S. boydii*, gule sirkler = *S. dysenteriae*, grønne sirkler = *S. flexneri*, mørkeblå sirkler = *S. sonnei*, lyseblå sirkler = *E. coli* og sirkler med flere farger viser forskjellige arter med samme MLVA profil.

5. Diskusjon

5.1. MLVA generelt

MLVA resultater kan enkelt deles mellom laboratorier verden over, men for å sammenligne resultatene direkte kreves likt kapillærelektroforeseinstrument og lik internstandard. Dersom et laboratorium ønsker å etablere MLVA metoden med ulikt instrument eller standard er det mulig å sammenligne resultater ved å finne en omregningsfaktor. Omregningsfaktoren kan finnes ved å analysere 50 eller flere stammer på både det originale og det nye instrumentet. Denne omregningsfaktoren korrigerer for forskjellene mellom instrumentene (47). Et argument mot MLVA kunne vært en manglende universell database med standardiserte MLVA-profiler for sammenligning, men en database ved Institutt Pasteur i Paris <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlva/> er under utarbeidelse med FHI som samarbeidspartner. Ved hjelp av denne databasen vil det bli lettere å spore mulige smittekilder på tvers av landegrensene (40). Selv uten en universell database er samarbeid mellom ulike land enkelt ved at MLVA profiler utveksles via e-post. Dette har for eksempel blitt gjort mellom Danmark og Norge, og England og Norge (41;47;61).

MLVA bør foreløpig ikke brukes til fylogenetiske studier, da VNTR loci sies å ha en høyhastighets "molekylær klokke" (38;62). En molekylær klokke måler evolusjonen til hele genomet ut ifra hastigheten av forandringer i bestemte DNA sekvenser. Hastigheten av variasjonene i VNTR loci kan ikke sammenlignes direkte med evolusjonshastigheten til hele genomet, da VNTR loci forandrer seg for ofte til dette (30;48). Det arbeides med å kartlegge mutasjonshastigheten til flere VNTR loci, slik at en "vektingsfaktor" kan legges til hvert VNTR locus. Når denne vektingsfaktoren er kjent er man nærmere muligheten til å benytte MLVA til evolusjonsstudier (32;63;64). Det er den høye molekylære klokkehastighet til VNTR loci som gjør disse områdene så velegnet til å type nært relaterte bakterieisolater. Det er tilfelle ettersom VNTR loci gir informasjon om variasjoner når det kanskje ikke er så mye annen variasjon i andre deler av genomet (62). MLVA er en metode med høy oppløsning og genotypingen skiller bakterier på artsnivå og nivåer under dette. Ved å kombinere fylogenetiske metoder med virotypiske analyser og MLVA får man det komplette bilde på slektsskap, virulensfaktorer og en bakterieprofil (65).

En bekymring er at ulike MLVA profiler kan oppstå ved et utbrudd forårsaket av en enkelt bakterieklon. Dette kommer av at VNTR områdene forandres så hyppig at ulike MLVA profiler oppstår for det samme utbruddet. (66). Et utbrudd vil på denne måten ikke oppdages ettersom bakterieprofilene i pasientene ikke er identisk med smitekilden (28). Det er derfor alltid nødvendig å undersøke stabiliteten til alle VNTR loci som benyttes til MLVA.

5.2. MLVA–*Shigella* metoden

For MLVA–*Shigella* metoden holder det å koke bakteriene i vann for å isolere DNA. Dette er den billigste og enkleste måten å isolere DNA på. Alle seks primerparene kan blandes til en PCR multipleks reaksjon, dette gjør MLVA–*Shigella* metoden til en svært hurtig og enkel metode.

5.2.1. Fargevalg

Fargevalget av de grønne fluorescerende primerene var muligens ikke optimalt, da det oppsto problemer under tolking av elektroferogrammene fra elektroforesen. SHTR3 og SHTR8 ble begge merket grønne og var ikke spesifikke for en art. Det kunne av og til være vanskelig å skille produktene til disse to primerparene fra hverandre. For eksempel viste det seg at SHTR3 og SHTR8 ga produkt på ca. 318 basepar for bakterieisolatene 1105-2301 og 1106-3315 (begge *S. boydii* serot.2), og dette kom til syne som en enkelt kurve i elektroferogrammet. Etter mistanke om at begge primerparene kunne ha gitt ca. like store PCR produkt, ble det utført ny PCR med primerparene SHTR3 og SHTR8 alene (for resultater se side 2 i vedlegg 3.). Blandingen av mange primere og kompatibiliteten av disse primerene sammen i en multipleks PCR for MLVA–*Shigella* metoden var ikke begrensende for metoden, muligheten for å merke primerene med kun tre farger kunne heller virke som en begrensning for metoden. Dersom man ønsket å inkludere flere primere, ville det mest sannsynlig bli vanskelig å bestemme hvilke primersett som har gitt hvilke PCR produkter når alle kjøres i samme kapillærelektroforesekjøring (50). Alternativt er det mulig å splitte den nåværende PCR multipleksen i to PCR multipleksreaksjoner, for to separate kjøring på ABI 310.

Ettersom så mange av primerene ga PCR produkter på rundt 300 basepar er det vanskelig å se hvilket fargevalg som kunne vært bedre. Det beste hadde vært å innføre en fjerde farge på enten SHTR3 eller SHTR8. Dette er mulig dersom ABI 3130 XL blir benyttet til MLVA, som kan skille fire farger i tillegg til fargen på internstandard. Fargevalget var ikke et problem for de andre primerene med fargene gult og blått. Primer SHTR7 med blå farge er kun spesifikk for *S. flexneri* og primer SHTR2 som også er blå, ga sjeldent utslag på flexneri. Når SHTR2 ga produkt med *S. flexneri* var disse produktene i en helt annen størrelsesorden og forårsaket ikke forvirring. SHTR7 har en også en praktisk nytteverdi, for den gir kun produkt med *S. flexneri* og vil derfor være med på å artsbestemme bakterieprøven.

5.2.2. Locusdiversitet

Locusdiversiteten (tabell 4-8.) ble målt etter "Simpsons index of diversity" (D) som viste særlig gode differensierende resultater for SHTR4. SHTR4 er det primersettet som gir best diversitet for *Shigella* sp. sammenlagt med D-verdi på 0,91. Totalt sett var det særlig gode D verdier for *S. sonnei* ettersom tre ulike primersett skilte denne arten med D-verdier på 0,89, 0,94 og 0,87. *S. flexneri* separeres svært godt av to ulike primersett med D-verdier på 0,95 og 0,88. Det er primersett SHTR7 som bidrar med den beste diversiteten for *S. flexneri* med D-verdi på 0,95. *S. boydii* skilles godt av to ulike primersett med D-verdier på 0,93 og 0,79. SHTR4 differensierte *S. dysenteriae* godt med en D-verdi på 0,88. MLVA-*Shigella* metoden viser best locusdiversitet for *S. sonnei* og *S. flexneri*, dette er svært gunstig ettersom disse to artene er de hyppigst forekommende i verden.

5.2.3. Tolking av dendrogram og minimum spanning tree (MST)

I utbruddsammenheng er det nyttig å kunne plassere bakterieisolat i dendrogram for å se om de klustrer seg sammen med tidligere sette profiler. Uansett om isolatene skiller seg ut fra tidligere sette profiler eller ikke, vil man være interessert i å se om de aktuelle sykdomstilfellene har lik MLVA profil og dermed felles opphav. Generelt sett er høy oppløselighet av MLVA-*Shigella* metoden viktig for å skille reelt ulike bakterieisolater, slik at mistanker om utbrudd ikke skal vekkes unødvendig. Under utvelgingen av bakterieisolater for MLVA-*Shigella* metoden ble det forsøkt å velge mest mulig ulike bakterieisolater for å unngå å type bakterier som har ført til sykdom hos flere mennesker og gir identisk MLVA profil. Slike identiske MLVA profiler vil gi falske lave diversitetsresultater for metoden. Ved å finne

reelt ulike bakterieisolater vil oppgaven med å bedømme om metoden separerer godt, bli mye riktigere. Ettersom utvelgelsen av bakterieisolater ble gjort i to omganger ble noen bakterieisolater tatt med som mest sannsynlig har samme kilde og dermed identisk MLVA profil. Disse isolatene har identiske profiler og stammenummer som tyder på isolering omtrent samtidig, de er også synlig i dendrogrammet:

1104-**0801** og 1104-**0802** fra *S. boydii* med profil 00-00-06-04-00-04

1105-**2509** og 1105-**2506** fra *S. dysenteriae* med profil 00-00-02-05-00-04

1106-**4029** og 1106-**4030** fra *S. flexneri* med profil 00-00-02-05-06-05

1106-**3296** og 1106-**3297** fra *S. sonnei* med profil 10-14-02-11-00-04

1107-**1519** og 1007-**1520** fra *S. sonnei* med profil 07-08-02-07-00-04

Utplukkingen av disse stammene ble opprinnelig gjort ved en feiltagelse, men er meget hensiktsmessig for oppgaven. Resultatene er nyttige ved at de viser at MLVA–*Shigella* metoden er i stand til å oppdage bakterieisolater med samme kilde fra ulike pasienter. I utbruddssammenheng vil flere pasienter være smittet av samme kilde, det er derfor viktig å vite at metoden klarer å klustre disse bakterieisolatene sammen med kun en utbruddsprofil.

Dendrogrammet differensierer *S. sonnei* og *S. flexneri* svært godt, som samsvarer med locusdiversitetresultatene. Det var noen *S. boydii* som ikke ble så godt differensiert i dendrogrammet. Disse resultatene stemmer også godt overens med locusdiversitetresultatene ettersom *S. boydii* har høyere D-verdier enn *S. dysenteriae*, men lavere enn *S. sonnei* og *S. flexneri*. Hvorvidt *S. boydii* blir differensiert godt nok til bruk i utbruddssammenheng vil komme frem av praktisk bruk av MLVA metoden fremover. Dendrogrammet differensierer ikke så godt mellom *S. dysenteriae*, som kommentert i resultatene. Dette er ytterligere kommentert i avsnitt 5.6.

Dendrogrammet fra MLVA–*Shigella* metoden sammensvarer godt med multilocus enzym elektroforesen (MLEE) dendrogrammet til Ochman *et al* (67). De analyserte over 1600 *E. coli* og 123 *Shigella* bakterieisolater. Deres dendrogram viste at *Shigella* stammene ikke samlet seg i en egen gren som forventes for en egen genus, men var gruppert innimellom to av tre overlappende *E. coli* grupper. De fire *Shigella* artene klustret seg heller ikke etter sin art, utenom *S. sonnei* som har skilt seg ut som en egen gren.. Dendrogrammet fra MLVA–*Shigella* metoden viser også at *E. coli* har spredt seg blant ulike *Shigella* arter, utenom blant *S. sonnei*. Dendrogrammet fra MLVA–*Shigella* metoden er ulik studien til Ochman *et al.* ved at

metoden også har skilt *S. flexneri* ganske godt i en gren, med noen isolater rundt om i dendrogrammet.

MST viser det samme som dendrogrammet for *S. flexneri*. *S. flexneri* har separert seg ut i en egen gren, med noen isolater rundt om kring. *S. sonnei* resultatene fra MST sammensvarer ikke med dendrogrammet. I MST har *S. sonnei* ikke gruppert seg som en egen gren, men er spredt rundt om i treet. *S. boydii* og *S. dysenteriae* har heller ikke gruppert seg sammen, men er spredt rundt om i MST. Ulikheter mellom dendrogrammet og MST for hvordan *Shigella* er gruppert kommer av forskjellige utregningmetoder. (28). Det at MST og dendrogrammet viser ulike grupperinger av *Shigella* sp. har ikke noe å si for utbruddsopklaring. I begge diagrammene vil identiske utbruddsprofiler vises som et kluster. I MST vil disse bakterieisolatene komme i samme sirkel og i dendrogrammet vil de vises med felles strek pga 100 % likhet. For utbruddsopklaring er et enkelt Microsoft excel ark godt nok til å finne identiske profiler (se vedlegg 3.). Ved hjelp av excelarket er det mulig å sortere data etter MLVA profil og på denne måten undersøke om bakterieisolatene har identiske profiler med tidligere sette profiler eller hverandre.

5.2.4. Reproduserbarhet og stabilitet

Flere nye MLVA metoder har blitt utprøvd ved Avdeling for næringsmiddelbårne infeksjoner ved FHI, som for bakteriene *Salmonella* og *E. coli* (49;68). Disse utprøvingene viste at MLVA som metode gir reproduserbare resultater.

Reproduserbarhetstesten for MLVA–*Shigella* metoden viste at MLVA profilene var identiske, som bekrefter at man kan stole på resultatene etter kun en typing. Flere paralleller er derfor ikke nødvendig. Resultatene fra stabilitetsstudien av MLVA–*Shigella* metoden viser at metoden er stabil da alle MLVA profilene var helt identiske etter gjentatte omsåinger. Disse loci kan derfor trygt brukes i utbruddssammenheng uten at det er nødvendig å tenke på at allelene kan mutere under utbrudd.

5.2.5. Sekvensering og IS-elementer

Sekvensering av VNTR områdene kreves for å verifisere at PCR produktenes polymorfi kommer av varierende antall repetisjonsenheter. IS-elementer kan dukke opp i VNTR områder og den eneste måten å oppdage dem på er ved sekvensering (52).

Farget SHTR1 forward primer ligger i et mobilt genetisk element, IS600. IS600 kan sette seg inn i genomet i begge DNA trådene i begge retninger, på denne måten blir SHTR1 forward primer med på reisen. Dersom to IS600 elementer setter seg nærme hverandre i hver sin DNA tråd og med motsatt orientering, vil dette skape bindesteder for to SHTR1 forward primere og gi et farget PCR produkt. SHTR1 forward primeren kan på denne måten fungere som både forward og reverse primer. Ved å flytte fargemerkingen fra SHTR1 forward primer til SHTR1 reverse primeren, vil ikke PCR produktet til to SHTR1 forward primere være synlig

Primer SHTR1 ga i stammenr 1106-4065 (*S. boydii serot.* 14) et avvikende stort produkt på 678 basepar, som ble sekvensert. Dette produktet viste seg å bestå av både forward og reverse SHTR1, ikke to SHTR1 forward primere som beskrevet over. SHTR1 reverse primer ligger i genet *hdhA* som også inneholder et fragment av et annet IS-element, IS4. Sekvenseringen av 1106-4065 viste derfor IS600 som har satt seg inn i et gen (*prpA*) og IS4 som har satt seg inn i *hdhA*, slik at begge genene blir inaktivert. I tillegg til dette ble det funnet en VNTR repetisjonsenhet i det sekvenserte produktet.

Sekvenseringsresultater fra primer SHTR1 i flere *S. sonnei* bekrefter at det er forandringer i antall VNTR repetisjoner som er årsaken til de varierende størrelsene i PCR produktet til SHTR1 i denne arten (tabell 4-5.). Det er best å se bort ifra SHTR1 produkter i andre arter enn *S. sonnei*, for å være sikker på at SHTR1 locus polymorfier kun kommer av ulike VNTR repetisjoner og ikke andre faktorer som IS-elementer. IS-elementer dukker ofte opp i VNTR områder, sannsynligvis skjer dette fordi IS-elementene søker etter inverte repetisjoner og hopper inn blant tandemrepetisjonene ved en feiltagelse.

Etter typing med MLVA ble de ulike allelstørrelsene oppgitt i basepar i elektroferogrammet. Disse baseparstørrelsene måtte gjøres om til et allelnummer. Allelnummer ble tildelt som beskrevet i 4.5 og etter tabell 4-4. Ved usikkerhet om det var funnet et nytt allel holdt det som regel å reanalysere PCR produktet på ABI 310. PCR produktet endret seg som oftest et eller

to basepar ved reanalyse, det var nok for å avgjøre om det var snakk om en ny allel eller ikke. Sekvenseringen (tabell 4-5.) for noen av PCR produktene som det var usikkerhet rundt, ble utført for å bekrefte alleltildelingen.

Økende baseparstørrelse for PCR produktene til hvert primersett skyldes økende antall repetisjonsenheter. Dette kommer frem av tabell 4-5. og sekvenseringsresultatene bekrefter dermed MLVA analysene for *Shigella* sp. *E. coli* resultatet med primer SHTR8 samsvarer ikke like godt som de andre sekvenseringsresultatene. Det kommer av at en primer kan sette seg på litt ulike steder både foran og etter VNTR området i ulike arter. Ettersom MLVA–*Shigella* metoden ikke skal benyttes til *E. coli* er ikke dette et problem i denne sammenheng.

5.2.6. *E. coli* undersøkt med MLVA–*Shigella* metoden

Det ble analysert altfor få *E. coli* på MLVA–*Shigella* metoden til at det er mulig å trekke konkrete slutninger om analysene. Utifra de få data som ble generert, tyder resultatene på at MLVA *Shigella* metoden ikke separerer *E. coli* særlig godt. De to *E. coli* isolatene oppgitt i tabell 4-3 ligner verken på *E. coli* eller *Shigella* ut ifra svake utslag på begge metodene.

5.3. MLVA–*E. coli* metoden

De foreløpige resultatene (se vedlegg 3) tyder på at MLVA–*E. coli* metoden separer *E. coli* bedre enn MLVA–*Shigella* metoden. Utvalget av analysert *E. coli* på begge metodene er egentlig for lite til å trekke konkrete slutninger av resultatene.

5.4. Utnyttelsesmulighetene av en MLVA-*Shigella* metode

Det er svært aktuelt med en ny metode for oppklaring av *Shigella* utbrudd da flere studier tyder på oppblomstring av multiresistente *Shigella* i u-land. Epidemier av denne art er en gjentakende utfordring i u-land. MLVA vil kunne bidra med å spore utbruddskilden raskt før en mulig epidemi kommer ut av kontroll. Trendene på hvilken *Shigella* art som forårsaker sykdom i ulike deler av verden har forandret seg i løpet av de siste 20 årene. Det er derfor nødvendig med sykdomsovervåking av endringene i *Shigella* art distribusjonen (18;69).

I utbruddssammenheng vil det være nødvendig å vente på en verifisering av bakterieart, men det vil ikke være essensielt å få en fullstendig fenotypisk analyse med alle serotypiske data.

Dette er mulig ved at de to andre epidemiologiske markørene kobles sammen:

En virotypisk undersøkelse gjøres ved å påvise gener som koder for de virologiske egenskapene og kan utføres med en allerede utarbeidet octaplex-PCR metode av Brandal *et al.* (65). Denne typingen gir en virulensgen-profil av *E. coli* og *Shigella*. For bakterien *Shigella* undersøkes det for om genet *ipaH* er tilstede. Ved å benytte denne metoden sammen med en genotypisk analyse som MLVA, vil man ha både virotypisk og genotypisk profiler for bruk til utbruddsoppløring. Disse metodene øker hastigheten til typingen, reduserer mengden av sykdomsfremkallende prøve som håndteres, reduserer sjansen for kontaminasjon og gir mulighet for fullstendig automatisering (65).

MLVA-*Shigella* metoden er en svært nyttig metode, både for i-land og u-land. *S. dysenteriae* type 1 er oppført på CDC sin liste over bioterror agens (70). *Shigella* er svært vertstilpasset mennesket og er ikke levedyktig lenge utenfor mennesket (2). Det kan derfor virke usannsynlig at *Shigella* er i stand til å skape store epidemier, men dette er mulig fordi det kreves så få organismer av bakterien for sykdom. Ettersom alle *Shigella* artene har ført til mye sykdom gjennom forurenset mat og vann, har det lenge vært ønsket en metode som raskt kan detektere, identifisere og spore *Shigella* sp. (15;35).

5.5. Pulsefelt gelelektroforese - PFGE

For PFGE kuttet DNA opp i forholdsvis store fragmenter og gir dermed ikke den høye oppløseligheten som MLVA gir (35). PFGE er fortsatt en mye brukt metode for oppløring av utbrudd og regnes som gullstandarden for typingen av flere bakterier. PulseNet er USA sitt nasjonale overvåkningsorgan for næringsmiddelbårne infeksjoner. De har standardiserte PFGE protokoller for syv ulike bakterier. Alle disse syv protokollene er unike for hver bakterie utenom for *E. coli* og *Shigella*, disse to bakteriene har identiske protokoller. PulseNet vurderer særlig VNTR baserte metoder for fremtidig bruk, og MLVA-*Shigella* metoden kan her bidra med en mer sensitiv metode (71).

Kultivering av bakteriene er nødvendig for PFGE, ettersom hele bakterier støpes inn i agarosegel (72). Dette er ofte svært patogene bakterier, som det av sikkerhetshensyn ikke er gunstig å arbeide med i levende form. For MLVA er det kun nødvendig å få isolert DNA en

gang, og videre arbeid utføres med DNAet og ikke levende bakterier. Tidligere har det blitt isolert DNA fra bakterier uten kultivering, for vellykket typing med MLVA. *B. anthracis* DNA har blitt ekstrahert fra lungene og *Bordetella pertussis* DNA har blitt isolert fra nesen, for typing med MLVA (36;50). Den fremste fordelene med MLVA over PFGE, er MLVA metodens hurtighet. For PFGE er det begrensende hvor mange bakterier det er mulig å type på en agarosegel. Generelt er PFGE en svært tidkrevende metode som ikke egner seg for typing av et stort antall bakterier (35). MLVA kan helautomatiseres med robot, ettersom det kun kreves en PCR før separasjon på kapillærelektroforese. Utveksling av PFGE data på tvers av laboratorier er ikke så lett fordi det er vanskelig å standardisere resultatene av typingen (35). MLVA resultatene fra elektroferogrammene oppgis i tall, som enkelt kan utveksles.

5.6. Andre genotypiske metoder

Andre genotypiske metoder som multiple-locus enzym electrophoresis (MLEE) og multiple-locus sequence typing (MLST) har ikke like høy oppløselighet som MLVA. MLEE og MLST er ikke i stand til å skille like godt mellom ulike isolater av en bakterie som MLVA. Dette kommer særlig til syne ved analyse av bakterier med lite genetisk variabilitet, som *Bacillus anthracis*. For *B. anthracis* var ikke MLEE eller MLST egnet til å vise genetisk variabilitet for bakterien, noe MLVA klarte (36). MLVA med en så god differensierende evne er derfor bedre egnet til utbruddsopklaring enn MLST og MLEE.

5.7. Fremtidig arbeid

For utvikling av MLVA–*Shigella* metoden ble åtte primersett konstruert, alle utenom et primersett ga PCR produkter i *Shigella* sp. Ved videre utprøving viste det seg at et av de syv primersettene ikke ga polymorfe PCR produkter, dette primersettet ble derfor forkastet. Begge de forkastede primersettene stammet opprinnelig fra *S. dysenteriae*. Ettersom *S. dysenteriae* er en så epidemiologisk viktig art ville det være svært gunstig å finne primere som separerer denne arten godt. For en komplett *Shigella* sp. MLVA metode bør det arbeides videre for et eller flere slike primersett. Med kun tre ulike farger for å merke seks primere ble det ikke uventet noen komplikasjoner. Den viktigste begrensningen for metoden ved å inkorporere mange primersett, er fargeutvalget for å merke primere. Ved å bytte kapillærelektroforese apparat kan fargeutvalget økes fra tre til fire, som vil gjøre tolkingen av elektroferogrammene mye klarere.

6. Konklusjon

I denne oppgaven er det blitt utviklet en MLVA metode for å identifisere og spore ulike stammer av *Shigella* sp. Metoden har vist svært god separasjonsevne for *S. sonnei* og *S. flexneri*. Det er særlig ett primersett (D-verdi 0,91) som har vist meget gode differensierende verdier for *Shigella* sp. Metoden ble svært hurtig og enkel ettersom alle seks primersettene kunne blandes til en PCR reaksjon med påfølgende kapillærelektroforese. Dette var mulig siden primersettene ble merket med ulike fluorescerende farger. MLVA–*Shigella* metoden har vist utmerket reproduserbarhet og stabilitet. MLVA–*Shigella* metoden er under videre utvikling for å inkludere locus fra *S. dysenteriae*, slik at metoden i fremtiden kan tas i bruk ved FHI til utbruddsundersøkelse og sykdomsovervåking.

MLVA er en moderne metode som genererer resultater direkte i digital form som gjør det enkelt å utveksle data mellom laboratorier. Med MLVA typing reduseres tiden som brukes på å behandle levende bakterier, og følgelig minsker infeksjonsrisikoen for laboratorieansatte. MLVA er i tillegg en dynamisk metode som kan forbedres og utvides etter hvert som flere nye primere og fluorescerende farger blir tilgjengelig for enda bedre separasjon av bakterien. Det er ingen grunn til at MLVA–*Shigella* metoden ikke kan erstatte andre genotypiske metoder i bruk i dag, ettersom MLVA metoden gir den høyeste mulige oppløsningen tilgjengelig.

7. Referanseliste

1. Dupont HL. *Shigella* species (Bacillary Dysentery). In: Mandell GL, Bennett JE, Raphael D, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles And Practice of Infectious Diseases*. 5 ed. Churchill Livingstone; 2000. p. 2363-9.
2. Keusch GT, Bennish ML. Shigellosis. In: Evans AS, Brachman PS, eds. *Bacterial infections of humans : epidemiology and control*. New York: Plenum Medical Book Company; 1991. p. 593-613.
3. Niyogi SK. Shigellosis. *J Microbiol* 2005;43:133-43.
4. Garrity GM, Bergey DH, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Springer; 2001.
5. Johnson JR. *Shigella* and *Escherichia coli* at the crossroads: machiavellian masqueraders or taxonomic treachery? *J Med Microbiol* 2000;49:583-5.
6. Levine MM, Kotloff KL, Barry EM, Pasetti MF, Sztein MB. Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. *Nature Reviews* 2007;5:540-53.
7. Collier L, Balows A, Sussman M. Balows A, Duerden BI, eds. *Systematic bacteriology*. Vol. 2 ed. 1998.
8. Pupo GM, Karaolis DK, Lan R, Reeves PR. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect Immun* 1997;65:2685-92.
9. Hyma KE, Lacher DW, Nelson AM, Bumbaugh AC, Janda JM, Strockbine NA, et al. Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains. *J Bacteriol* 2005;187:619-28.
10. Pupo GM, Lan R, Reeves PR. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10567-72.
11. Ashida H, Toyotome T, Nagai T, Sasakawa C. *Shigella* chromosomal IpaH proteins are secreted via the type III secretion system and act as effectors. *Mol Microbiol* 2007;63:680-93.
12. Parsot C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol Lett* 2005;252:11-8.
13. Nasjonalt folkehelseinstituttet. Smittsomme sykdommer fra a-å: Shigellose [Nasjonalt folkehelseinstitutt]. [updated 2007 Jul]. Available from: <http://www.fhi.no/dav/9d13d1e6f7.pdf>.
14. Daskalakis DC, Blaser MJ. Another perfect storm: *Shigella*, men who have sex with men, and HIV. *Clin Infect Dis* 2007;44:335-7.

15. Clemens JD, Kotloff KL, Bradford K. Generic protocol to estimate the burden of Shigella diarrhoea and dysenteric mortality.: Department of vaccines and biologicals, World Health Organization; 1995 May.
16. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, et al. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organ 1999;77:651-66.
17. Norsk legemiddelhåndbok. Shigellaenteritt, basillær dysenteri [Norsk legemiddelhåndbok]. [updated 2007]. Available from: <http://www.legemiddelhandboka.no/xml/>.
18. Taneja N, Lyngdoh V, Vermani A, Mohan B, Rao P, Singh M, et al. Re-emergence of multi-drug resistant Shigella dysenteriae with added resistance to ciprofloxacin in north India & their plasmid profiles. Indian J Med Res 2005;122:348-54.
19. Salyers AA, Whitt DD, ed. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Washington, D.C.: ASM Press; 2002.
20. Bennish ML, Wojtyniak BJ. Mortality due to shigellosis: community and hospital data. Rev Infect Dis 1991;13 Suppl 4:S245-S251.
21. Center for Disease Control and Prevention, Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Shigellosis [Center for Disease Control and Prevention, USA]. [updated 2005 Oct 12]. Available from: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/shigellosis_g.htm.
22. Phalipon A, Sansonetti PJ. Shigella's ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? Immunol Cell Biol 2007;85:119-29.
23. Cohen D, Green M, Block C, Slepon R, Ambar R, Wasserman SS, et al. Reduction of transmission of shigellosis by control of houseflies (Musca domestica)[see comment. Lancet 1991;337:993-7.
24. Statens Serum Institut. Shigella infektion [Statens Serum Institut, Danmark]. [updated 2007 Sep]. Available from: <http://www.ssi.dk/sw1255.asp>.
25. Khan MU. Interruption of shigellosis by hand washing. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene 1982;76:164-8.
26. World Health Organization. Guidelines for the control of epidemics due to shigella dysenteriae type 1 [World Health Organization]. 1-55. [updated 1995 Mar 28]. Available from: http://www.who.int/child-adolescent-health/New_Publications/CHILD_HEALTH/WHO.CDR.95.4.pdf.
27. American Academy of Pediatrics. Shigellosis. In: Report of the Committee on Infectious Diseases. Elk Grove Village, Ill.: The Academy; 1991. p. 670.
28. Lindstedt BA. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. Electrophoresis 2005;26:2567-82.

29. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biology of microorganisms. Tenth ed. Upper Saddle River, NJ 07458: Prentice Hall; 2003.
30. van Belkum A. The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:306-11.
31. van Belkum A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2007;49:22-7.
32. Noller AC, McEllistrem MC, Shutt KA, Harrison LH. Locus-specific mutational events in a multilocus variable-number tandem repeat analysis of *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Microbiol* 2006;44:374-7.
33. Budowle B, Giusti AM, Wayne JS, Baechtel FS, Fournay RM, Adams DE, et al. Fixed-bin analysis for statistical evaluation of continuous distributions of allelic data from VNTR loci, for use in forensic comparisons. *Am J Hum Genet* 1991;48:841-55.
34. Devlin B, Risch N, Roeder K. Estimation of allele frequencies for VNTR loci. *Am J Hum Genet* 1991;48:662-76.
35. Cebula TA, Jackson SA, Brown EW, Goswami B, LeClerc JE. Chips and SNPs, bugs and thugs: a molecular sleuthing perspective. *J Food Prot* 2005;68:1271-84.
36. Hoffmaster AR, Fitzgerald CC, Ribot E, Mayer LW, Popovic T. Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, United States. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1111-6.
37. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 2000;182:2928-36.
38. Vergnaud G, Pourcel C. Multiple Locus VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) Analysis. In: Stackebrandt E, ed. *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2006. p. 83-104.
39. Liang SY, Watanabe H, Terajima J, Li CC, Liao JC, Tung SK, et al. Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis for Molecular Typing of *Shigella sonnei*. *J Clin Microbiol* 2007;
40. Kapperud G. Bakteriene har fått personnummer! Nasjonalt folkehelseinstitutt, Avdeling for næringsmiddelbårne infeksjoner (SMAN) 2007 Oct 19.
41. Torpdahl M, Sorensen G, Lindstedt BA, Nielsen EM. Tandem repeat analysis for surveillance of human *Salmonella Typhimurium* infections. *Emerg Infect Dis* 2007;13:388-95.
42. Patel SJ, Graham PL, III. Use of molecular typing in infection control. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:527-9.

43. Sambrook J, Russell DW. Russell DW, ed. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
44. Kapperud G. Årsrapport 2006, Nasjonal referansefunksjon for næringsmiddelbårne bakterier.: Nasjonalt folkehelseinstitutt; 2007 Jul 5.
45. Nasjonalt folkehelseinstitutt. Meldingssystem for smittsomme sykdommer, MSIS statistikk [Nasjonalt folkehelseinstitutt]. [updated 2007]. Available from: <http://www.msis.no/>.
46. Kapperud G. Nygård K, ed. Oppklaring av utbrudd av næringsmiddelbårne sykdommer og zoonoser: håndbok i oppklaring av sykdomsutbrudd hos mennesker som skyldes smitte fra næringsmidler eller dyr. 13 ed. Oslo: Folkehelse; 2006.
47. Lindstedt BA, Torpdahl M, Nielsen EM, Vardund T, Aas L, Kapperud G. Harmonization of the multiple-locus variable-number tandem repeat analysis method between Denmark and Norway for typing *Salmonella* Typhimurium isolates and closer examination of the VNTR loci. *J Appl Microbiol* 2007;102:728-35.
48. Lewin B. Genes VIII. Upper Saddle River, N.J.: Pearson Prentice Hall; 2004.
49. Lindstedt BA, Vardund T, Kapperud G. Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis of *Escherichia coli* O157 using PCR multiplexing and multi-colored capillary electrophoresis. *J Microbiol Methods* 2004;58:213-22.
50. Schouls LM, van der Heide HG, Vauterin L, Vauterin P, Mooi FR. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s. *J Bacteriol* 2004;186:5496-505.
51. Lindstedt BA, Heir E, Gjernes E, Vardund T, Kapperud G. DNA fingerprinting of shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 based on multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis (MLVA). *Annals of Clinical Microbiology & Antimicrobials* 2003;2, 2003. Date of Publication: 10 DEC 2003.
52. Lindstedt BA, Brandal LT, Aas L, Vardund T, Kapperud G. Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates for use in a genotyping assay. *J Microbiol Methods* 2007;69:197-205.
53. Budowle B, Johnson MD, Fraser CM, Leighton TJ, Murch RS, Chakraborty R. Genetic analysis and attribution of microbial forensics evidence. *Crit Rev Microbiol* 2005;31:233-54.
54. Agilent Technologies. 2100 Bioanalyzer, Lab-on-a-Chip [Agilent Technologies]. [updated 2007]. Available from: <http://www.chem.agilent.com/Scripts/PCol.asp?lPage=50>.
55. Pedersen-Bjergaard S. Spektroskopiske metoder for legemiddelanalyse Bind 1. 3. utgave ed. Farmasøytisk institutt, UiO; 1999.

56. NanoDrop Technologies. NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 V3.3. User's Manual. 2007.
57. Applied Biosystems. ABI Prism Genetic Analyzer, User Guide. 2001.
58. Applied Biosystems. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol. 2002.
59. Pedersen-Bjergaard S. Kjemisk analyse av legemidler med kapillærelektroforese. Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo; 2005.
60. Greibrokk T, Lundanes E, Rasmussen KE, Karlsen J, eds. Kromatografi: separasjon og deteksjon. [Oslo]: Universitetsforlaget; 1994.
61. Best EL, Lindstedt BA, Cook A, Clifton Hadley FA, Threlfall EJ, Liebana E. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium: comparison of isolates from pigs, poultry and cases of human gastroenteritis. *J Appl Microbiol* 2000;0:???
62. Johansson A, Forsman M, Sjøstedt A. The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis*. *APMIS* 2004;112:898-907.
63. Hyttia-Trees E, Smole SC, Fields PA, Swaminathan B, Ribot EM. Second generation subtyping: a proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157). *Foodborne Pathogens and Disease* 2006;3:118-31.
64. Vogler AJ, Keys C, Nemoto Y, Colman RE, Jay Z, Keim P. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 2006;188:4253-63.
65. Brandal LT, Lindstedt BA, Aas L, Stavnes TL, Lassen J, Kapperud G. Octaplex PCR and fluorescence-based capillary electrophoresis for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Microbiol Methods* 2007;68:331-41.
66. Noller AC, McEllistrem MC, Pacheco AG, Boxrud DJ, Harrison LH. Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:5389-97.
67. Ochman H, Whittam TS, Causant DA, Selander RK. Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *J Gen Microbiol* 1983;129:2715-26.
68. Lindstedt BA, Vardund T, Aas L, Kapperud G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *J Microbiol Methods* 2004;59:163-72.
69. Taneja N. Changing epidemiology of shigellosis and emergence of ciprofloxacin-resistant *Shigellae* in India. *J Clin Microbiol* 2007;45:678-9.

70. Center for Disease Control and Prevention. Food Safety Threats, Specific Agents and Diseases [Center for Disease Control and Prevention, USA]. [updated 2007]. Available from: <http://www.bt.cdc.gov/agent/food/>.
71. Gerner-Smidt P, Hise K, Kincaid J, Hunter S, Rolando S, Hyytia-Trees E, et al. PulseNet USA: a five-year update. *Foodborne Pathogens and Disease* 2006;3:9-19.
72. Center for Disease Control and Prevention PU. One-Day (24-28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* 0157:H7, non-typhoidal *Salmonella*, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) [Center for Disease Control and Prevention, PulseNet USA]. [updated 4 A.D. Jun]

Vedlegg 1: Sammensetninger

1.1 Sammensetning av medier:

Stikkagar 1 %:

Lab Lemco, Oxoid L29	4g
Bacto-peptone BD (Difco) 211677	10g
NaCl Applichem 1371	3g
Dinatriumhydrogenfosfat x 12 H ₂ O Applichem 3906	2g
Bacto-Agar, BD (Difco) 214010	10 g
Destilert vann	1 l
1M NaOH, pH justeres til 7,4	

Laktoseagar:

BTB laktoseagar, Biolife 401272	30,7 g
5 M HCl, pH justeres til 6,3	ca. 1,8 ml
Destilert vann	1 l

1.2. Sammensetning av ulike produkter:

TE-buffer, pH 7:

100 X TE-buffer (= 1M Tris og 0,1M EDTA)	0,1 ml
Steril vann	10 ml

2 X Qiagen Multiplex PCR Master Mix:

- HoStar Taq DNA Polymerase
- Qiagen Multiplex PCR Buffer, inneholder: 6 mM MgCl₂, pH 8,7
- dTP Mix, inneholder: dATP, dCTP, dGTP, dTTP

5 X Nucleic Acid Sample Loading Buffer:

- Glycerol
- 50 mM Tris pH 8,0
- 5 mM EDTA
- Bromfenol blått
- xylene cyanole FF

EZ Load 100 bp DNA Molecular Rular og EZ Load 500 bp DNA Molecular Rular:

- Glycerol
- 15 mM Tris pH 8,0
- 1,5 mM EDTA
- Bromofenol blått
- xylene cyanole FF

Stopp mix:

- Evans blue 0,5 %
- Glycerol

0,5 TBE-buffer, pH 8:

5 X TBE-buffer (0,45 M Tris, 0,45 M Borsyre, 0,1M EDTA)	0,1 l
Destilert vann	0,9 l

TBE-buffer, pH 8:

5 X TBE-buffer(0,45 M Tris, 0,45 M Borsyre, 0,1M EDTA)	0,2 l
Destilert vann	0,8 l

Agarosegel 1 %:

Agarose Sea Kem LE, 50004	1g
0,5X TBE-buffer, pH 8	100 ml

EtBr bad:

EtBr 10mg/ml	10µl
TBE-buffer, pH 8	1 l

EDTA:

10 x EDTA	10 ml
Sterilt vann	90 ml

Vedlegg 2: Utprøving av åtte ulike primersett med 20 *Shigella* bakterieisolater.

Tabellen viser en oversikt over alle primersettene som har gitt bånd under utprøvingen. SHTR6 er det eneste primersettet som ikke har gitt noen bånd.

		*	<i>S. sonnei</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. flexneri</i>
DNA nr.	Stammenr.	Bakterie	SHTR1	SHTR2	SHTR3	SHTR4	SHTR5	SHTR6	SHTR7	SHTR8
A46	1020-6332	Shigella dysenteriae ser2	-	+	+	+	+	-	-	+
A47	1030-3917	Shigella dysenteriae ser2	-	+	+	+	+	-	-	+
A48	1104-0364	Shigella dysenteriae ser3	-	-	+	+	+	-	-	+
A49	1104-0546	Shigella dysenteriae ser3	-	-	+	+	+	-	-	+
A50	1104-3126	Shigella dysenteriae ser4	-	-	+	+	+	-	-	+
A51	1104-3332	Shigella sonnei	+	+	+	+	+	-	-	+
A52	1104-3345	Shigella sonnei	+	+	+	+	+	-	-	+
A53	1104-3402	Shigella sonnei	+	+	+	+	+	-	-	+
A54	1104-3403	Shigella sonnei	+	+	+	+	+	-	-	+
A55	1104-3422	Shigella sonnei	+	+	-	+	+	-	-	+
A56	1104-1675	Shigella boydii ser2	-	-	+	+	+	-	-	+
A57	1104-1869	Shigella boydii ser13	-	+	+	+	+	-	-	+
A58	1104-1955	Shigella boydii ser2	-	-	+	+	+	-	-	+
A59	1104-3039	Shigella boydii ser4	-	-	+	+	+	-	-	+
A60	1104-3288	Shigella boydii ser2	-	-	+	+	+	-	-	+
A61	1104-3200	Shigella flexneri ser3	-	-	+	+	+	-	+	+
A62	1104-3238	Shigella flexneri ser1	-	+	+	+	+	-	+	+
A63	1104-3270	Shigella flexneri ser6	-	-	+	+	+	-	-	+
A64	1104-3372	Shigella flexneri ser2	-	-	+	+	+	-	+	+
A65	1104-3404	Shigella flexneri ser5	-	-	+	+	+	-	+	+

* raden oppgir opprinnelsen til primersettet

+ betyr bånd på agarosegel

- betyr manglende bånd på agarosegel

Vedlegg 3: Allelbaseparstørrelsene funnet i MLVA–*Shigella* metoden

Stamme nr	Bakterie	** <i>S. sonnei</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella</i>	<i>E. coli</i>
		SHTR1	SHTR2	SHTR3	SHTR4	SHTR7	SHTR8	MLVA profil	MLVA profil
1106-2506	<i>Escherichia coli</i>	0	262	287	153	0	317	00-01-02-06-00-04	
ECOR17	<i>Escherichia coli</i> O:106	0	262	288	153	0	0	00-01-02-06-00-00	05-00-00-08-03-05-01
1020-6607	<i>Escherichia coli</i> O:128	0	0	0	0	0	317	00-00-00-00-00-04	00-00-00-00-00-00-01
1030-6430	<i>Escherichia coli</i> O:128	0	0	0	0	0	319	00-00-00-00-00-04	00-00-00-00-00-00-01
ECOR72	<i>Escherichia coli</i> O:144	0	262	288	195	0	318	00-01-02-13-00-04	06-03-00-08-03-12-01
1106-1037	<i>Escherichia coli</i> O:157	0	262	288	148	0	317	00-01-02-05-00-04	06-10-01-03-05-04-01
ECOR52	<i>Escherichia coli</i> O:25	0	263	288	154	0	317	00-01-02-06-00-04	05-03-00-10-03-02-01
ECOR7	<i>Escherichia coli</i> O:85	0	262	288	196	0	317	00-01-02-13-00-04	06-03-00-08-03-12-01
ECOR34	<i>Escherichia coli</i> O:88	0	262	288	168	0	318	00-01-02-08-00-04	06-03-00-08-03-07-01
1106-3542	<i>Escherichia coli</i> O?	0	0	288	0	0	0	00-00-02-00-00-00	00-00-00-00-00-00-01
ECOR45	<i>Escherichia coli</i> O?	0	262	288	166	0	318	00-01-02-08-00-04	06-03-00-08-03-07-01
1104-0088	<i>Shigella boydii</i>	0	0	313	141	0	317	00-00-06-04-00-04	
1104-0228	<i>Shigella boydii</i>	0	0	313	141	0	318	00-00-06-04-00-04	
1103-0783	<i>Shigella boydii</i>	0	0	325	207	0	317	00-00-08-15-00-04	
1104-0298	<i>Shigella boydii</i>	0	262	288	160	0	317	00-01-02-07-00-04	
1107-0017	<i>Shigella boydii</i>	0	263	287	129	0	317	00-01-02-02-00-04	
1104-0814	<i>Shigella boydii</i>	0	0	312	141	0	317	00-00-06-04-00-04	
1021-0124	<i>Shigella boydii</i>	0	0	287	250	0	0	00-00-02-18-00-00	
1104-0715	<i>Shigella boydii</i>	0	0	312	141	0	318	00-00-06-04-00-04	
1104-0801	<i>Shigella boydii</i>	0	0	312	141	0	318	00-00-06-04-00-04	
1104-0802	<i>Shigella boydii</i>	0	0	312	141	0	317	00-00-06-04-00-04	
1105-2411	<i>Shigella boydii</i> serot. 1	0	0	288	189	0	0	00-00-02-12-00-00	
1021-1794	<i>Shigella boydii</i> serot. 1	0	0	287	231	0	0	00-00-02-17-00-00	
1020-6503	<i>Shigella boydii</i> serot. 10	0	0	288	207	0	0	00-00-02-15-00-00	
1020-2989	<i>Shigella boydii</i> serot. 11	0	262	288	166	0	317	00-01-02-08-00-04	
1021-0005	<i>Shigella boydii</i> serot. 11	0	262	287	154	0	317	00-01-02-06-00-04	
1105-1148	<i>Shigella boydii</i> serot. 13	0	283	288	124	0	317	00-02-02-01-00-04	

1011-2697	<i>Shigella boydii</i> serot. 13 sannsynlig	0	388	287	124	0	318	00-15-02-01-00-04	
1030-2175	<i>Shigella boydii</i> serot. 14	0	0	300	153	0	318	00-00-04-06-00-04	
1106-1495	<i>Shigella boydii</i> serot. 14	0	0	338	178	0	318	00-00-10-10-00-04	
1106-4065	<i>Shigella boydii</i> serot. 14	678	0	300	172	0	318	00-00-04-09-00-04	
1107-0941	<i>Shigella boydii</i> serot. 2	0	0	312	141	0	317	00-00-06-04-00-04	
1107-0605	<i>Shigella boydii</i> serot. 2	0	0	338	147	0	317	00-00-10-05-00-04	
1107-1179	<i>Shigella boydii</i> serot. 2	0	0	312	141	0	317	00-00-06-04-00-04	
1105-2301	<i>Shigella boydii</i> serot. 2	0	0	319	154	0	318	00-00-07-06-00-04	
1106-1528	<i>Shigella boydii</i> serot. 2	0	0	313	135	0	318	00-00-06-03-00-04	
1106-3822	<i>Shigella boydii</i> serot. 2	0	0	312	154	0	318	00-00-06-06-00-04	
1107-1018	<i>Shigella boydii</i> serot. 2	0	0	344	195	0	318	00-00-11-13-00-04	
1106-3315	<i>Shigella boydii</i> serot. 2	0	0	319	178	0	317	00-00-07-10-00-04	
1105-1269	<i>Shigella boydii</i> serot. 2	0	0	312	154	0	317	00-00-06-06-00-04	
1106-0772	<i>Shigella boydii</i> serot. 4	0	0	344	172	0	318	00-00-11-09-00-04	
1105-3143	<i>Shigella boydii</i> serot. 4	0	0	306	160	0	318	00-00-05-07-00-04	
1105-0762	<i>Shigella boydii</i> serot. 4	0	0	325	160	0	317	00-00-08-07-00-04	
1106-2948	<i>Shigella boydii</i> serot. 4	0	0	344	202	0	317	00-00-11-14-00-04	
1105-1024	<i>Shigella boydii</i> serot. 4	0	0	344	177	0	317	00-00-11-10-00-04	
1106-2088	<i>Shigella boydii</i> serot. 4	0	0	331	153	0	318	00-00-09-06-00-04	
1106-3202	<i>Shigella boydii</i> serot. 4	0	0	356	207	0	318	00-00-12-15-00-04	
1106-4254	<i>Shigella boydii</i> serot. 4	0	0	325	160	0	318	00-00-08-07-00-04	
1106-2674	<i>Shigella boydii</i> serot. 8	0	0	288	213	0	0	00-00-02-16-00-00	
1107-1020	<i>Shigella boydii</i> serot. 8	0	0	288	268	0	0	00-00-02-19-00-00	
1107-0944	<i>Shigella boydii</i> serot. 8	0	0	287	268	0	0	00-00-02-19-00-00	
1106-0939	<i>Shigella boydii</i> serot. 9	0	353	288	130	0	295	00-11-02-02-00-01	
1010-6540	<i>Shigella boydii</i> /E.coli	0	402	288	124	0	318	00-17-02-01-00-04	
1020-2639	<i>Shigella boydii</i> /E.coli	0	347	288	124	0	318	00-10-02-01-00-04	
1103-9758	<i>Shigella dysenteriae</i>	0	262	288	154	0	309	00-01-02-06-00-03	
1107-0212	<i>Shigella dysenteriae</i>	0	0	287	153	0	317	00-00-02-06-00-04	
1106-2987	<i>Shigella dysenteriae</i>	0	0	288	178	0	317	00-00-02-10-00-04	
1020-3594	<i>Shigella dysenteriae</i>	0	262	288	147	0	309	00-01-02-05-00-03	
2126/85	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.1	0	0	287	130	0	0	00-00-02-02-00-00	

3579/83	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.1	0	0	287	130	0	0	00-00-02-02-00-00	
605/94	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.1	0	0	288	129	0	0	00-00-02-02-00-00	
53/95	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.1	0	0	287	129	0	0	00-00-02-02-00-00	
1000-3022	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.1	0	0	288	129	0	0	00-00-02-02-00-00	
1001-2957	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.1	0	0	288	129	0	0	00-00-02-02-00-00	
1020-4990	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.1	0	0	287	129	0	0	00-00-02-02-00-00	
FH-Ba-500	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.1	0	0	0	135	0	0	00-00-00-03-00-00	
1105-0592	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	195	0	310	00-01-02-13-00-03	
1105-0889	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	147	0	310	00-01-02-05-00-03	
1106-2847	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	135	0	310	00-01-02-03-00-03	
1105-0859	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	147	0	310	00-01-02-05-00-03	
1106-3998	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	135	0	310	00-01-02-05-00-03	
1107-0160	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	263	288	135	0	309	00-01-02-03-00-03	
1030-6141	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	160	0	310	00-01-02-07-00-03	
1103-0758	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	154	0	310	00-01-02-06-00-03	
1020-4045	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	0	288	154	0	317	00-00-02-06-00-04	
E1603/99	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	166	0	310	00-01-02-08-00-03	
E2953/97	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	154	0	310	00-01-02-06-00-03	
E2826/97	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	147	0	310	00-01-02-05-00-03	
E2684/97	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	160	0	309	00-01-02-07-00-03	
E2462/97	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	154	0	310	00-01-02-06-00-03	
1000-4059	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	287	184	0	309	00-01-02-11-00-03	
1011-0261	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	160	0	310	00-01-02-07-00-03	
1105-1268	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.3	0	0	288	154	0	318	00-00-02-06-00-04	
1105-2509	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.3	0	0	288	147	0	318	00-00-02-05-00-04	
1105-2508	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.3	0	0	288	147	0	318	00-00-02-05-00-04	
1990-0636	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.3	0	0	288	147	0	317	00-00-02-05-00-04	
1990-0796	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.3	0	0	287	166	0	318	00-00-02-08-00-04	
1001-1447	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.3	0	0	288	147	0	317	00-00-02-05-00-04	
1104-0190	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.4	0	0	288	160	0	318	00-00-02-07-00-04	
E1281/99	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.4	0	0	287	178	0	317	00-00-02-10-00-04	

E2641/97	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.4	0	0	288	195	0	317	00-00-02-13-00-04	
E195/99	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.7	0	0	294	160	0	317	00-00-03-07-00-04	
1105-1410	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.8	0	262	288	178	0	318	00-01-02-10-00-04	
1106-0316	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.9	0	0	288	141	0	317	00-00-02-04-00-04	
1030-4909	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	288	166	503	324	00-00-02-08-13-05	
1104-0097	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	288	189	467	325	00-00-02-12-09-05	
1103-0481	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	288	160	384	317	00-00-02-07-01-04	
1104-0238	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	286	172	466	325	00-00-02-09-09-05	
1104-0076	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	286	160	548	325	00-00-02-07-17-05	
1104-0111	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	319	147	0	317	00-00-07-05-00-04	
1106-4028	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	287	147	438	324	00-00-02-05-07-05	
1106-4029	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	288	147	429	325	00-00-02-05-06-05	
1106-4030	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	288	148	429	324	00-00-02-05-06-05	
1106-4091	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	287	166	484	325	00-00-02-08-11-05	
1106-1539	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	287	153	421	325	00-00-02-06-05-05	
1106-3211	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	288	203	0	0	00-00-02-14-00-00	
1104-3299	<i>Shigella flexneri</i> serot. 5	0	0	287	154	429	325	00-00-02-06-06-05	
1106-1578	<i>Shigella flexneri</i> serot. X	0	0	288	166	402	325	00-00-02-08-03-05	
1107-0921	<i>Shigella flexneri</i> serot.1	0	0	287	166	521	325	00-00-02-08-15-05	
1107-1001	<i>Shigella flexneri</i> serot.1	0	0	287	147	521	325	00-00-02-05-15-05	
1107-1065	<i>Shigella flexneri</i> serot.1	0	0	288	166	402	325	00-00-02-08-03-05	
1107-1122	<i>Shigella flexneri</i> serot.1	0	0	288	172	576	325	00-00-02-09-18-05	
1020-8473	<i>Shigella flexneri</i> serot.1	0	0	287	166	448	325	00-00-02-08-08-05	
1104-0767	<i>Shigella flexneri</i> serot.1	0	0	288	147	402	325	00-00-02-05-03-05	
1107-0877	<i>Shigella flexneri</i> serot.1	0	0	288	160	439	325	00-00-02-07-07-05	
1020-8091	<i>Shigella flexneri</i> serot.2	0	0	288	160	512	325	00-00-02-07-14-05	
1105-0523	<i>Shigella flexneri</i> serot.2	0	0	288	135	522	325	00-00-02-03-15-05	
1107-1420	<i>Shigella flexneri</i> serot.2	0	0	287	166	411	325	00-00-02-08-04-05	
1107-0790	<i>Shigella flexneri</i> serot.2	0	0	288	172	429	325	00-00-02-09-06-05	
1107-1049	<i>Shigella flexneri</i> serot.2	0	0	287	172	467	325	00-00-02-09-09-05	
1105-2236	<i>Shigella flexneri</i> serot.2	0	0	287	166	477	325	00-00-02-08-10-05	
1105-2497	<i>Shigella flexneri</i> serot.2	0	0	288	154	476	325	00-00-02-06-10-05	
1105-2791	<i>Shigella flexneri</i> serot.2	0	0	287	166	412	325	00-00-02-08-04-05	

1105-3275	<i>Shigella flexneri</i> serot.2	0	0	287	166	540	325	00-00-02-08-16-05	
1105-3300	<i>Shigella flexneri</i> serot.2	0	0	287	141	540	325	00-00-02-04-16-05	
1107-0876	<i>Shigella flexneri</i> serot.4	0	0	287	183	393	316	00-00-02-11-02-04	
1030-6018	<i>Shigella flexneri</i> serot.4	0	0	288	160	476	325	00-00-02-07-10-05	
1106-0706	<i>Shigella flexneri</i> serot.4	0	0	288	160	0	317	00-00-02-07-00-04	
1107-1448	<i>Shigella flexneri</i> serot.4	0	0	287	166	429	325	00-00-02-08-06-05	
1107-1191	<i>Shigella flexneri</i> serot.4	0	0	288	172	0	0	00-00-02-09-00-00	
1105-1309	<i>Shigella flexneri</i> serot.4a	0	0	287	160	467	325	00-00-02-07-09-05	
1103-0341	<i>Shigella flexneri</i> serot.5	0	0	288	154	438	325	00-00-02-06-07-05	
1106-0091	<i>Shigella flexneri</i> serot.5	0	0	288	166	475	325	00-00-02-08-10-05	
1107-1081	<i>Shigella flexneri</i> serot.5	0	0	287	147	385	316	00-00-02-05-01-04	
1105-0462	<i>Shigella flexneri</i> serot.6	0	0	330	184	0	317	00-00-09-11-00-04	
1107-1143	<i>Shigella flexneri</i> serot.6	0	0	312	166	0	318	00-00-06-08-00-04	
1104-0145	<i>Shigella flexneri</i> serot.x	0	0	287	166	512	325	00-00-02-08-14-05	
1105-3264	<i>Shigella flexneri</i> serot.y	0	0	288	148	494	325	00-00-02-05-12-05	
T4/97	<i>Shigella flexneri</i> -EHEC	0	262	282	154	0	317	00-01-01-06-00-04	
2771/97	<i>Shigella flexneri</i> -EHEC	0	262	287	129	0	317	00-01-02-02-00-04	
1104-0022	<i>Shigella sonnei</i>	345	381	287	160	0	317	09-14-02-07-00-04	
1104-0092	<i>Shigella sonnei</i>	345	408	288	201	0	317	09-18-02-14-00-04	
1104-0164	<i>Shigella sonnei</i>	302	325	288	232	0	317	04-07-02-17-00-04	
1104-0300	<i>Shigella sonnei</i>	327	346	288	172	0	317	06-10-02-09-00-04	
1104-0302	<i>Shigella sonnei</i>	345	326	288	159	0	317	09-07-02-07-00-04	
1106-3296	<i>Shigella sonnei</i>	351	381	287	184	0	317	10-14-02-11-00-04	
1106-3297	<i>Shigella sonnei</i>	350	381	287	184	0	317	10-14-02-11-00-04	
1106-3338	<i>Shigella sonnei</i>	350	381	287	184	0	317	10-14-02-11-00-04	
1020-2310	<i>Shigella sonnei</i>	302	318	288	172	0	318	04-06-02-09-00-04	
1020-9606	<i>Shigella sonnei</i>	302	304	288	178	0	318	04-04-02-10-00-04	
1030-2614	<i>Shigella sonnei</i>	321	416	288	154	0	317	05-19-02-06-00-04	
1030-6190	<i>Shigella sonnei</i>	302	311	288	172	0	317	04-05-02-09-00-04	
1104-0868	<i>Shigella sonnei</i>	327	374	288	184	0	317	06-13-02-11-00-04	
1104-3271	<i>Shigella sonnei</i>	357	325	288	154	0	317	11-07-02-06-00-04	
1105-1154	<i>Shigella sonnei</i>	302	304	288	172	0	317	04-04-02-09-00-04	
1105-2845	<i>Shigella sonnei</i>	369	311	288	153	0	317	13-05-02-06-00-04	

1106-1079	<i>Shigella sonnei</i>	325	394	288	166	0	316	06-16-02-08-00-04	
1106-3306	<i>Shigella sonnei</i>	345	339	288	166	0	317	09-09-02-08-00-04	
1107-1519	<i>Shigella sonnei</i>	333	332	288	160	0	318	07-08-02-07-00-04	
1107-1520	<i>Shigella sonnei</i>	333	332	288	160	0	317	07-08-02-07-00-04	
1107-0262	<i>Shigella sonnei</i>	302	332	287	166	0	317	04-08-02-08-00-04	
1107-0331	<i>Shigella sonnei</i>	327	304	288	172	0	317	06-04-02-09-00-04	
1107-0339	<i>Shigella sonnei</i>	364	409	288	160	0	317	11-18-02-07-00-04	
1107-0433	<i>Shigella sonnei</i>	327	346	288	195	0	317	06-10-02-13-00-04	
1107-0535	<i>Shigella sonnei</i>	381	339	288	160	0	317	15-09-02-07-00-04	
1107-0719	<i>Shigella sonnei</i>	357	346	288	153	0	317	11-10-02-06-00-04	
1107-0741	<i>Shigella sonnei</i>	302	374	288	166	0	317	04-13-02-08-00-04	
1107-0740	<i>Shigella sonnei</i>	357	367	288	172	0	317	11-12-02-09-00-04	
1107-0771	<i>Shigella sonnei</i>	339	417	288	161	0	318	08-19-02-07-00-04	
1107-0844	<i>Shigella sonnei</i>	303	332	288	207	0	300	04-08-02-15-00-02	
1106-2422	<i>Shigella sonnei</i>	340	340	288	160	0	317	08-09-02-07-00-04	
1106-2672	<i>Shigella sonnei</i>	327	339	288	160	0	318	06-09-02-07-00-04	
1106-2648	<i>Shigella sonnei</i>	333	353	287	154	0	317	07-11-02-06-00-04	
1106-1683	<i>Shigella sonnei</i>	321	0	288	160	0	317	05-00-02-07-00-04	
1105-1632	<i>Shigella sonnei</i>	375	417	288	213	0	317	14-19-02-16-00-04	
1106-1625	<i>Shigella sonnei</i>	339	346	287	154	0	317	08-10-02-06-00-04	
1106-1742	<i>Shigella sonnei</i>	302	290	0	172	0	317	04-03-00-09-00-04	
1106-2070	<i>Shigella sonnei</i>	339	325	287	160	0	317	08-07-02-07-00-04	
1106-3086	<i>Shigella sonnei</i>	345	402	287	147	0	317	09-17-02-05-00-04	
1106-2654	<i>Shigella sonnei</i>	345	325	287	196	0	317	09-07-02-13-00-04	
1106-1540	<i>Shigella sonnei</i>	325	330	288	154	0	316	06-08-02-06-00-04	
1107-1374	<i>Shigella sonnei</i>	364	373	288	154	0	317	12-13-02-06-00-04	
1105-2988	<i>Shigella sonnei</i>	345	332	288	166	0	317	09-08-02-08-00-04	

*Første rad oppgir bakteriearten de ulike primerparene stammer fra

Kolonne nummer to viser alle bakterieisolatene typet med MLVA-*Shigella* metoden, sortert etter art. De ulike fargene på kolonnenne illustrer fargene på PCR produktet fra elektroferogrammet. Nest siste kolonne viser MLVA-*Shigella* profil og siste kolonne viser MLVA-*E.coli* profil for de 10 *E. coli* analysert med den metoden.

Vedlegg 4: Reproduserbarhetsstudie

Tabell 1. Tabellen viser allelbaseparstørrelsene for de 19 bakteriene som ble undersøkt for reproduserbarhetsstudien. Tabellen viser resultatene etter første typing, tallene er hentet fra vedlegg 3. MLVA profilene er vist i siste kolonne.

Stamme nr	Bakterie	SHTR1	SHTR2	SHTR3	SHTR4	SHTR7	SHTR8	Shigella MLVA profil
1104-0092	<i>Shigella sonnei</i>	345	408	288	201	0	317	09-18-02-14-00-04
1105-2791	<i>Shigella flexneri</i> serot.2	0	0	287	166	412	325	00-00-02-08-04-05
1105-1410	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.8	0	262	288	178	0	318	00-01-02-10-00-04
1105-2508	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.3	0	0	288	147	0	318	00-00-02-05-00-04
1106-3086	<i>Shigella sonnei</i>	345	402	287	147	0	317	09-17-02-05-00-04
2126/85	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.1	0	0	287	130	0	0	00-00-02-02-00-00
1107-0339	<i>Shigella sonnei</i>	364	409	288	160	0	317	11-18-02-07-00-04
1105-3300	<i>Shigella flexneri</i> serot.2	0	0	287	141	540	325	00-00-02-04-16-05
E2641/97	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.4	0	0	288	195	0	317	00-00-02-13-00-04
1107-1081	<i>Shigella flexneri</i> serot.5	0	0	287	147	385	316	00-00-02-05-01-04
1010-6540	<i>Shigella boydii</i> /E.coli	0	402	288	124	0	318	00-17-02-01-00-04
1107-0790	<i>Shigella flexneri</i> serot.2	0	0	288	172	429	325	00-00-02-09-06-05
1105-0889	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	147	0	310	00-01-02-05-00-03
1106-2070	<i>Shigella sonnei</i>	339	325	287	160	0	317	08-07-02-07-00-04
1107-0160	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	263	288	135	0	309	00-01-02-03-00-03
1106-1539	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	288	153	421	325	00-00-02-06-05-05
1107-1020	<i>Shigella boydii</i> serot. 8	0	0	288	268	0	0	00-00-02-19-00-00
1104-0145	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	287	166	512	325	00-00-02-08-14-05
1030-6141	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	160	0	310	00-01-02-07-00-03

Tabell 2. Tabellen viser allelbaseparstørrelsene for de 19 bakteriene som ble undersøkt for reproduserbarhetsstudien. Tabellen viser resultatene etter andre typing. MLVA profilene er vist i siste kolonne og er identisk med MLVA profilene fra første typing.

Stamme nr	Bakterie	SHTR1	SHTR2	SHTR3	SHTR4	SHTR7	SHTR8	Shigella MLVA profil
1104-0092	<i>Shigella sonnei</i>	345	409	288	201	0	317	09-18-02-14-00-04
1105-2791	<i>Shigella flexneri serot.2</i>	0	0	288	166	411	325	00-00-02-08-04-05
1105-1410	<i>Shigella dysenteriae serot.8</i>	0	262	287	178	0	317	00-01-02-10-00-04
1105-2508	<i>Shigella dysenteriae serot.3</i>	0	0	288	147	0	318	00-00-02-05-00-04
1106-3086	<i>Shigella sonnei</i>	344	401	287	147	0	317	09-17-02-05-00-04
2126/85	<i>Shigella dysenteriae serot.1</i>	0	0	288	130	0	0	00-00-02-02-00-00
1107-0339	<i>Shigella sonnei</i>	263	409	287	160	0	317	11-18-02-07-00-04
1105-3300	<i>Shigella flexneri serot.2</i>	0	0	288	141	539	325	00-00-02-04-16-05
E2641/97	<i>Shigella dysenteriae serot.4</i>	0	0	288	195	0	317	00-00-02-13-00-04
1107-1081	<i>Shigella flexneri serot.5</i>	0	0	287	147	384	317	00-00-02-05-01-04
1010-6540	<i>Shigella boydii/E.coli</i>	0	402	288	125	0	317	00-17-02-01-00-04
1107-0790	<i>Shigella flexneri serot.2</i>	0	0	288	172	429	325	00-00-02-09-06-05
1105-0889	<i>Shigella dysenteriae serot.2</i>	0	263	287	147	0	310	00-01-02-05-00-03
1106-2070	<i>Shigella sonnei</i>	338	326	288	159	0	317	08-07-02-07-00-04
1107-0160	<i>Shigella dysenteriae serot.2</i>	0	263	288	135	0	310	00-01-02-03-00-03
1106-1539	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	288	154	420	325	00-00-02-06-05-05
1107-1020	<i>Shigella boydii serot. 8</i>	0	0	288	268	0	0	00-00-02-19-00-00
1104-0145	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	288	166	512	325	00-00-02-08-14-05
1030-6141	<i>Shigella dysenteriae serot.2</i>	0	262	288	160	0	310	00-01-02-07-00-03

Vedlegg 5: Stabilitetsstudie

De tre tabellene viser allelbaseparstørrelsene til de fire bakterieisolatene analysert ved ulike tidspunkt for stabilitetsstudie. MLVA profilene er vist i siste kolonne i de tre tabellene. Tabellene viser at MLVA profilene for de fire bakteriene er identiske ved de tre ulike tidspunktene.

Tabell 1. Tabellen vises allelbaseparstørrelsene til de fire bakterieisolatene fra første MLVA typing, før omsåingen begynte.

Stamme nr	Bakterie	SHTR1	SHTR2	SHTR3	SHTR4	SHTR7	SHTR8	Shigella MLVA profil
1105-3264	<i>Shigella flexneri</i> serot.y	0	0	288	148	494	325	00-00-02-05-13-05
1106-2674	<i>Shigella boydii</i> serot. 8	0	0	288	213	0	0	00-00-02-16-00-00
1105-2845	<i>Shigella sonnei</i>	369	311	288	153	0	317	13-05-02-06-00-04
1105-0889	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	147	0	310	00-01-02-05-00-03

Tabell 2. Tabellen vises allelbaseparstørrelsene til de fire bakterieisolatene fra andre MLVA typing, underveis i omsåingen.

Stamme nr	Bakterie	SHTR1	SHTR2	SHTR3	SHTR4	SHTR7	SHTR8	Shigella MLVA profil
1105-3264	<i>Shigella flexneri</i> serot.y	0	0	288	147	494	324	00-00-02-05-13-05
1106-2674	<i>Shigella boydii</i> serot. 8	0	0	287	213	0	0	00-00-02-16-00-00
1105-2845	<i>Shigella sonnei</i>	369	310	287	154	0	316	13-05-02-06-00-04
1105-0889	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	287	147	0	310	00-01-02-05-00-03

Tabell 3. Tabellen vises allelbaseparstørrelsene til de fire bakterieisolatene fra siste MLVA typing, etter siste omsåing.

Stamme nr	Bakterie	SHTR1	SHTR2	SHTR3	SHTR4	SHTR7	SHTR8	Shigella MLVA profil
1105-3264	<i>Shigella flexneri</i> serot.y	0	0	287	147	494	325	00-00-02-05-13-05
1106-2674	<i>Shigella boydii</i> serot. 8	0	0	287	212	0	0	00-00-02-16-00-00
1105-2845	<i>Shigella sonnei</i>	369	312	287	153	0	317	13-05-02-06-00-04
1105-0889	<i>Shigella dysenteriae</i> serot.2	0	262	288	147	0	309	00-01-02-05-00-03